

SÉRIE A, N° 3781

N° D'ORDRE :

4632

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

PAUL KAISER

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE DU SOL ET
D'AUTRES SUBSTRATS NATURELS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **19 DEC. 1961** devant la Commission d'examen.

MM. THOMAS..... *Président.*

BARRAUD.....

HELLER.....

} *Examineurs.*

L A V A L
IMPRIMERIE BARNÉOUD S. A.

1961

SÉRIE A, N° 3781

N° D'ORDRE :

4632

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

PAUL KAISER

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE DU SOL ET
D'AUTRES SUBSTRATS NATURELS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

devant la Commission d'examen.

MM. THOMAS.....	<i>Président.</i>
BARRAUD.....	} <i>Examineurs.</i>
HELLER.....	



LAVAL
IMPRIMERIE BARNEOUD S. A.

1961

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY.

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	QUELET	T	Chimie organique.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	CAIGNARD	T	Géophysique appliquée
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	CHAMPETIER	T	Chimie macromolécul.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	JUNG	T	Pétrographie.
PLANTEFOL	T	Botanique.	TRILLAT	T	Microscopie et diffract. électronique.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.	WIEMANN	T	Chimie organique et structurale.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	JACQUINOT	T	Spectroscopie (Orsay).
BOULIGAND	T	Analyse appliquée à la Géométrie.	VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	DESTOUCHES	T	Théories physiques.
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie.	PRUVOST	T	Géologie.
TEISSIER	T	Zoologie.	AMIEL	T	Chimie des solides.
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay).	HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie.
AUGER	T	Physique quantique et Relativité.	J.-P. MATHIEU	T	Recherches physiques.
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.	COUTEAUX	T	Biol. animale (P.C.B.).
PIVETEAU	T	Paléontologie.	MAY	T	Zoologie (Orsay).
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	CHROQUET	T	Théor. des fonctions et Topologie.
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	FELDMANN	T	Biol. végétale (P.C.B.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.	GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay).
FAVARD	T	Géométrie supérieure.	JOST	T	Physiologie comparée.
COULOMB	T	Physique du Globe.	FORTET	T	Calcul des probabilités.
M ^{lle} COUSIN	T	Biologie.	SCHWARTZ	T	Calc. diff. et intégr.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
DRACH	T	Zoologie.	MALAVARD	T	Aviation (Techn. aéronaut.).
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).	BRELOT	T	Calcul différentiel.
EPHRESSI	T	Génétique.	NORMANT	T	Synthèse organique générale.
RIVIÈRE	T	Géologie (Orsay).	BÉNARD	T	Chimie (E.N.S.C.P.).
GAUTHERET	T	Biologie (P.C.B.).	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.	DUGUÉ	T	Statistiques mathém.
THOMAS A.	T	Biol. cellulaire.	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ARNOLF	T	Optique appliquée.	ULRICH	T	Physiologie végétale (E.N.S.).
MORAND	T	Physique Enseignement.	MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).	KIRRMANN	T	Théories chimiques.
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.	GAUDEAUD	T	Botanique.
DANJON	T	Astronomie.	M ^{lle} LE BRETON	T	Physiologie.
PETIT	T	Biologie maritime.	SALEM	T	Mathématiques générales.
QUÉNEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.	LELONG	T	Mathématiques générales.
GALLIEN	T	Embryologie.	DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.
EICHHORN	T	Biol. végétale (P.C.B.).	ERTESMANN	T	Topologie algébrique.
DE CUGNAC	T	Biol. végétale (S.P.C.N.).	FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.).
M ^{lle} CAUCHOIS	T	Chimie physique.	GLANGEAUD	T	Géogr. physique et Géologie dynamique.
THELLIER	T	Physique du Globe.	GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay).	PISOT	T	Calcul des probabilités.
GHIVET	T	Radioélectricité (Orsay).	ROCH	T	Géologie.
PUNCIN	T	Mécanique générale.	SCHATZMANN	T	Astrophysique.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.	TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.

PROFESSEURS (suite)

ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.	JULIA M.	Chimie organ. structu-
LENNUIER	T	Physique (P.C.B.).		rale.
RIZET	T	Génétique (Orsay).	LENDER	Biol. animale (S.P.C.N.)
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.		(Orsay).
M ^{me} TONNELAT	T	Relativité.	MAGAT	Physico-chim. des rayon-
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).		nements.
SOUGHAY	T	Chimie (P.C.B.).	M ^{lle} QUINTIN	T Electrochimie.
ALGRAIN	T	Electrotechn. générale.	MONOD	T Biochimie cellulaire.
BRUSSET		Chimie minérale.	BENOIT	T Physiologie animale (Or-
M. LÉVY	T	Physique théorique des		say).
		hautes énergies (Or-	DE POSSEL	T Analyse numérique.
		say).	CHARLOT	T Chimie analytique.
M ^{me} CHAIX	T	Chimie biologique.	HAÏSSINSKY	T Radiochimie.
M ^{me} HUREL-PY		Biol. vég. (P.C.B.).	LEMEER	T Physiologie (B.M.P.V.)
PIAUX	T	Chimie (S.P.C.N.).		(Orsay).
BRUN	T	Mécanique expérimentale des fluides.	GUÉRIN	T Chimie (Orsay).
LEDERER	T	Chimie biologique.	CHATELET M.	Chimie (P.C.B.).
M ^{me} DUBREIL	T	Mathématiques (Agrég.).	JEAN	Physique (Orsay).
M ^{me} LELONG	T	Mathém. (E.N.S.).	MATTLER	T Physique (Orsay).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).	MICHEL Louis	Physique théorique (Or-
COTTE	T	Physique (M.P.C.).		say).
DUBOIS J. E.	T	Chimie (M.P.C.).	RUMPF	Chimie (P.C.B.).
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).	BERGERARD	Biologie animale (S.P.
MICHEL André	T	Chimie minérale (Or-		C.N.) (Orsay).
		say).	BERTEIN	Électronique (Orsay).
OLMER	T	Énergétique générale.	BOUSSIÈRES	Chimie des Radioélé-
ROUAULT	T	Physique.		ments (Orsay).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.	M ^{me} COUTURE	Thermodynamique et
BARCHWITZ	T	Chimie physique.		Mécanique physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.	ELLENBERGER	Géologie appliquée.
BUSER		Biol. animale (P.C.B.).	FRANC	Biologie animale (P.C.B.).
CAMUS		Biol. végétale (P.C.B.).	SCHNELL	Botanique tropicale (Or-
CASTAING	T	Physique (Orsay).		say).
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie.	STOLKOWSKI	Biologie animale (P.C.B.).
MOYSE	T	Physiol. vég. (Orsay).	ACHER	Chimie biolog. (Orsay).
PANNETIER	T	Chimie (Orsay).	BAUDOIN	Biologie.
POSSOMPES	T	Biol. animale (P.C.B.).	BEAUMONT	Biologie animale
PULLMANN		Chimie théorique.	BLAMONT	Géophysique Ionosphère.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et	BOURREAU	Biol. végétale (S.P.C.N.)
		Radioactivité (Orsay).		(Orsay).
TONNELAT		Biol. physico-chimique.	CURIE D.	Physique (M.G.P.).
VILLE	T	Économétrie.	DURAND-DELGA ...	Géologie.
WILLEMART		Chimie (P.C.B.).	FRÉON	Chimie organique (Or-
DODÉ	T	Chimie (Orsay).		say).
FREYMANN	T	Physique (S.P.C.N.).	HELLER	Physiologie végétale.
GUINOCHET	T	Biol. vég. (Orsay).	TORTRAT	Calcul des probabilités.
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.).	CAILLEUX	Géologie (S.P.C.N.).
M ^{lle} JOSIEN	T	Chimie (P.C.B.).	MAGNAN	T Physique (P.C.B.).
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et	DAUDEL	Mécanique ondulatoire
		théorie des groupes.		appliquée à la Chimie
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).		théorique et à la Phy-
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).		sique nucléaire.
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).	M ^{lle} FOURCROY	Biol. végétale (S.P.C.N.).
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay).	BARRAUD	Physiologie cellulaire.
			NOÏROT	Évolution des êtres orga-
GERMAIN	T	Mécanique théorique des		nisés.
		fluides.	M ^{me} FOURES-BRUHAT	T Mécanique analytique et
LUCAS G.	T	Géologie.		Mécanique céleste.
ALLARD	T	Chimie physique.	M ^{lle} VEIL	Physiologie générale.
BERTHELOT	T	Physique fondamentale	LWOFF	T Microbiologie.
		des hautes énergies	SIESTRUNCK	T Mécanique physique et
		(Orsay).		expérimentale.
BRICARD	T	Météorologie.	LACOMBE	T Métallurgie (Orsay).
M ^{me} ALBE-FESSARD.		Psychophysiologie.	BROCHARD	T Physique (P.C.B.) (Orsay)
FRIEDEL		Physique des Solides	CABANNES	T Mécanique générale.
		(Orsay).	LESIEUR	T Mathématiques (M.P.C.)
				(Orsay).
			MAZET	T Mécanique générale (Or-
				say).

Secrétaire Général R. POULLAIN.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

Nos ancêtres les plus lointains ont bénéficié du phénomène de pectinolyse. Poussés par le besoin de se vêtir pour mieux supporter le froid, ou tout simplement pour s'orner de parures, les hommes récoltaient, au hasard, sur le sol des étoupes de fibres textiles libérées de leur gangue pectinique par les microorganismes rouisseurs. C'est beaucoup plus tard que l'humanité apprenait à rouir les plantes textiles dans les endroits sélectionnés de certaines rivières à courant lent. Sous l'impulsion de la Science, les auteurs du ^{xix}^e siècle devaient expliquer ce phénomène et isoler les microorganismes responsables. De ce fait le rouissage devenait une industrie scientifiquement dirigée.

Presque parallèlement, lorsque nos ancêtres passèrent de la vie nomade à la vie sédentaire, certains microorganismes pectinolytiques devinrent l'ennemi de l'homme, détruisant par pourriture de nombreuses cultures de racines et de tubercules. Ce sont ces méfaits qui, au siècle dernier attirèrent les regards des phytopathologistes lesquels devaient, eux aussi, isoler des plantes pourries, des germes pectinolytiques de toute nature.

Pendant longtemps, on ne connut ainsi de la pectinolyse que les germes rouissants anaérobies et les microorganismes phytopathogènes : Champignons et Bactéries. Mais, comme nous le verrons plus loin, en détail, la pectine est une substance que contiennent en abondance presque tous les végétaux.

A la mort de ceux-ci ou lors de la chute saisonnière des feuilles ou d'autres parties de plantes, le sol va donc recevoir des substances pectiques en quantité considérable. Elles seront métabolisées par les microorganismes du sol munis des enzymes de la pectinolyse qui assureront ainsi le retour de cette substance organique à l'état minéralisé.

Or, nous sommes très peu renseignés sur la dégradation de la pectine dans le sol comme l'a écrit J. Pochon, dans son traité de *Microbiologie du sol*.

Tout récemment (1950-1960), quelques auteurs (M. Raynaud, A.-R. Prévot, Wieringa, Lambina, Dorey) ont posé les premiers jalons dans l'étude de cette fonction. Nous pensons donc que ce travail apportera une nouvelle contribution dans l'étude des agents de la pectinolyse du sol, microorganismes trop longtemps négligés.

Ces recherches ont été effectuées dans le Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur. Nous avons été dirigé par M. le Professeur A.-R. Prévot qui nous a fait profiter de sa vaste culture et de sa précieuse expérience et dont la sollicitude et les conseils ne nous ont jamais fait défaut.

Que ce soit pour nous l'occasion de témoigner toute notre reconnaissance à M. le Professeur Prévot.

Notre gratitude va aussi à M. le Professeur F. Chodat, Directeur de l'Institut de Botanique à l'Université de Genève, qui nous fit découvrir et aimer la Microbiologie.

M. le Professeur Tréfouël, Directeur de l'Institut Pasteur et M. le Docteur Aublant, Secrétaire Général, nous ont accueilli à l'Institut Pasteur et ont toujours manifesté une grande bienveillance à notre égard. Nous leur exprimons notre respectueuse reconnaissance.

C'est grâce aux moyens mis sans réserve à notre disposition et aux subventions généreuses du Fonds National Belge d'Interventions Sociales et Scientifiques que nous avons pu poursuivre ce travail ; nous adressons donc nos remerciements les plus vifs au Comte P. de Launoit et au Professeur Van Straelen.

Nous ne saurions oublier l'accueil et l'appui que nous avons trouvé auprès de MM. les Professeurs Pochon, Brisou, Manigault, Segrétain, lorsque nous avons eu recours à leur compétence.

Nous remercions encore tous nos collègues du Service des Anaérobies ainsi que le personnel technique près desquels nous avons toujours trouvé une aide efficace.

Enfin, que MM. les Professeurs Thomas, Barraud, Heller, qui ont bien voulu accepter la charge de juger notre travail, trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.

LA PECTINE, SUBSTANCE VÉGÉTALE

La pectine substance découverte en 1825 par H. Braconnot (16) est le ciment intercellulaire de la plupart des végétaux supérieurs. Les végétaux à croissance rapide, contenant beaucoup d'eau, constitués surtout de cellules avec paroi cellulaire primaire en contiennent plus spécialement (105). Dans les bois et autres tissus secondaires, lignifiés, la pectine, par contre, ne constitue qu'une fraction négligeable du végétal (105). Il y a donc modification constante du taux de pectine au cours des différents stades de croissance d'une même plante. D'après D. H. Northcote (105), on peut faire le schéma suivant pour la répartition des substances pectiques dans la paroi d'une cellule végétale à maturité (fig. 1).

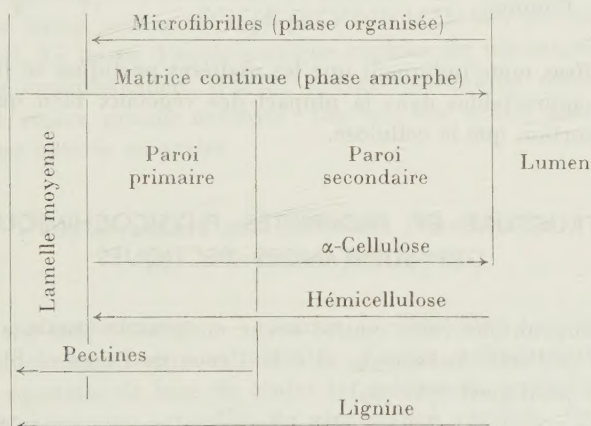


FIG. 1.

Nous donnons ici quelques chiffres indiquant la teneur en pectine de différentes plantes en pourcentage de matière sèche (extrait de Kertesz, *The Pectic Substances*) (76).

Feuilles :

Aulne	4,83 %
Blé	1,0-1,7 »
Dent-de-lion	7,81 »

Graminées de pâture :

« Cocks foot »	2,0	%
« Kentucky blue »	6,5	»
Tilleul	20,2	»
Lierre	7,4	»

Bois :

Frêne écorce	7	%
» aubier	1	»
Pin blanc aubier	0,3	»
» cambium-phloème ..	21,0	»

Autres organes :

Carotte (racine)	7,4	%
Pomme de terre (tubercule)	4	»
Pomme	17	»

Ces chiffres nous indiquent que les matières pectiques se trouvent en quantités appréciables dans la plupart des végétaux bien qu'en moins forte proportion que la cellulose.

STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DES SUBSTANCES PECTIQUES

(Nous empruntons cette courte revue en grande partie au livre de Kertesz, *The Pectic Substances* et à la *Revue* de Deuel et Stutz sur les substances pectiques) (76) (29).

Le terme « pectine » est un dérivé du grec « $\pi\eta\chi\tau\omicron\varsigma$ » signifiant : gélifié ou solidifié (Braconnot) (16).

1) Définitions des substances pectiques.

En avril 1944, la Société Américaine de Chimie a adopté officiellement la nomenclature révisée des substances pectiques définies comme suit :

« Les substances pectiques sont des dérivés d'hydrate de carbone sous forme colloïdale. Ces substances se trouvent dans les végétaux ou sont préparées à partir de ceux-ci. Les molécules de ces substances sont composées de maillons d'acide anhydrogalacturonique groupés en chaînes.

Les groupes carboxyles des acides polygalacturoniques peuvent être partiellement estérifiés par des groupes méthyles et partiellement ou complètement neutralisés par une ou plusieurs bases.

« Le terme « protopectine » est appliqué aux substances pectiques insolubles dans l'eau qui se trouvent dans les plantes et qui, après hydrolyse ménagée, donnent des acides pectiniques.

« Le terme d'acides pectiniques est employé pour l'acide polygalacturonique colloïdal contenant une quantité appréciable de groupes méthylés. »

Les acides pectiniques dans certaines conditions sont capables de former des gels avec des sucres (saccharose) à pH acide ; si les groupes méthylés sont en moindre proportion, les acides pectiniques forment des gels avec des ions métalliques. Les sels des acides pectiniques sont des pectinates neutres ou acides.

Le terme pectine désigne les acides pectiniques, hydrosolubles capables de former des gels avec des sucres et à pH acide dans des conditions appropriées. Le pourcentage de groupes méthylés est variable (très souvent, le terme pectine est appliqué à tous les acides pectiniques, sans distinction). Le terme d'acide pectique englobe les substances pectiques composées essentiellement d'acide polygalacturonique colloïdal et ne contenant aucun groupe méthylé. Les sels des acides pectiques sont des pectates neutres ou acides.

2) *Structure des différents constituants des substances pectiques.*

Acide galacturonique. — Comme la définition l'indique, l'acide polygalacturonique composé d'unités d'acide anhydrogalacturonique forme le squelette de base de toutes les substances pectiques. Dans les substances pectiques naturelles de provenance végétale, on ne trouve que l'acide α -D-galacturonique sous sa forme pyranose (fig. 2).

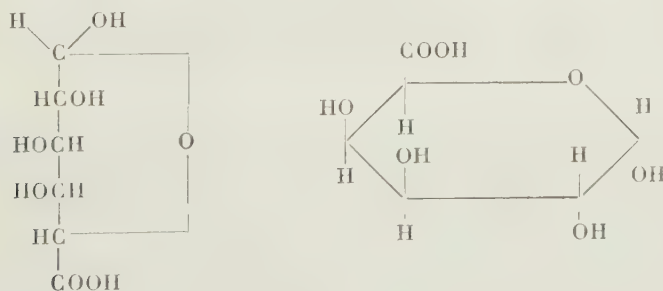


FIG. 2. — Acide D-galacturonique sous sa forme pyranose.

Acides pectiques. — D'après la définition des substances pectiques, la structure pectique la plus simple est un acide polygalacturonique qui contient juste assez d'unités d'acide galacturonique pour avoir des propriétés colloïdales ; cette forme est l'acide pectique. Toutes les autres substances pectiques sont dérivées de cet acide par addition de différents groupes. D'après Morell, Baur et Link (103) l'acide pectique devrait contenir un minimum de 8-10 unités d'acide galacturonique pour avoir des propriétés colloïdales. La structure de l'acide pectique varie selon les différents travaux mais, en général, il découle que l'acide pectique est formé de maillons d'acide polyanhydro- α -D-galacturonique sous forme pyranose, assemblés par un pont glucosidique dans les positions 1 et 4'. Le polymère appartient donc au groupe des trans-1,4'-poly-saccharides (Eliezer et Hayman) (40). La figure 3 nous montre un tronçon de la chaîne d'acide pectique selon Haworth.

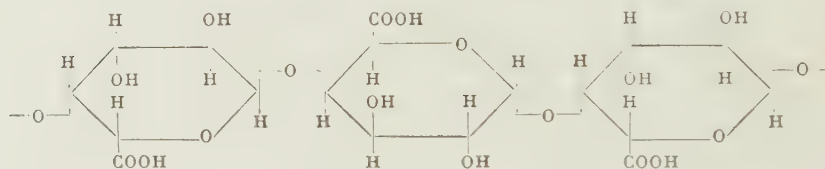


FIG. 3. — *Acide pectique (tronçon de la chaîne).*

La chaîne de pectate de Na montre une structure colloïdale triple et les chaînes sont assemblées en paquets serrés (Palmer et Hartzog) (112).

Le poids moléculaire de l'acide pectique des végétaux varie entre 30 000 et 200 000 : Säverborn (142) indique les chiffres suivants : pectine de lin : 64 000 ; pectine de carotte : 58 000 ; pectine de citron : 89 000. D'après Schneider et Bock (146) : pectine de pomme : 280 000 ; pectine de citron : 220 000 ; pectine de betterave : 25 000. Les molécules d'acide pectique sont donc des macromolécules filiformes à poids moléculaire élevé.

Pectine et acide pectinique. — Théoriquement, les molécules de pectine peuvent contenir un maximum de 16,3 % de groupes méthylés. Ce chiffre n'a toutefois jamais été trouvé. Les pectines fortement méthylées en contiennent en moyenne de 13 à 15 %. Les pectines formant des gels avec des cations polyvalents ne contiennent que 3 à 7 % de ces groupes. La figure 4 montre un tronçon de la molécule de pectine.

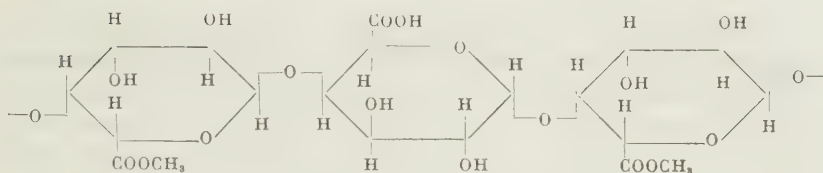


FIG. 4. — Tronçon de la molécule de pectine.

Dans certains cas, les groupes hydroxyls sont partiellement acétylés. En effet, les pectines de betterave à sucre, lin et tabac contiennent d'importantes quantités d'acide acétique (Deuel et Stutz) (29).

Nous reproduisons ici un maillon acétylé de la chaîne de pectine d'après E. A. McCombs et R. M. McCready (92) (fig. 5).

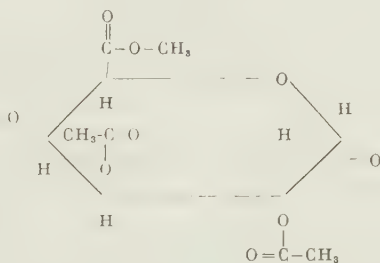


FIG. 5. — Maillon acétylé de la molécule de pectine.

Protopectine. — La structure et la composition des molécules de protopectine sont très peu définies et mal connues. Elles sont hétérogènes et varient suivant les différents végétaux et leurs tissus. L'insolubilité de la protopectine tiendrait à sa liaison avec des protéines ou avec de la cellulose ou encore à la présence d'ions polyvalents tels que Ca^{++} et Fe^{+++} .

3) Quelques propriétés physicochimiques des substances pectiques.

a) **Solubilité.** — Les pectines sont solubles dans l'eau, le formamide, l'éthylène diamine et le glycérol à chaud, mais insolubles dans la plupart des solvants organiques. Plus la chaîne est courte, et plus l'estérification des groupes carboxyls augmente, plus la solubilité dans l'eau est forte ; ainsi l'acide pectique est insoluble dans l'eau. Les pectines étant des colloïdes ne forment pas de solutions vraies, mais des suspensions colloïdales.

b) *Propriétés optiques.* — La rotation spécifique ($[\alpha]_D^{20}$) de l'acide galacturonique est de $+51^\circ$. La rotation spécifique des substances pectiques dépend fortement de leur poids moléculaire pour l'acide pectique, elle varie entre 170° et 230° ; la pectine de citron montre une rotation spécifique de 230° . Les solutions aqueuses de pectines montrent une biréfringence positive qui augmente avec le poids moléculaire.

c) *Viscosité, formation de gels.* — Les solutions aqueuses de pectines fortement polymérisées sont visqueuses.

La formation de gels dépend principalement de la longueur des molécules de pectine et du degré d'estérification des groupes carboxylés. Des pectines d'un poids moléculaire de 280 000 et 220 000 ont un pouvoir gélifiant très élevé alors qu'une pectine de betterave d'un P. M. de 25 000 en est totalement dépourvu. Trois sortes de gels peuvent avoir lieu selon les substances pectiques employées :

1) Gel formé avec une pectine fortement méthylée, en présence d'un minimum de 30 % de saccharose et avec un pH compris entre 2 et 3,5 ;

2) Gel formé avec un acide pectinique fortement déméthylé en présence de cations polyvalents (Ca^{++}) ;

3) Gel formé par l'acide pectique insoluble dans l'eau.

Les gels 1 et 2 sont thermolabiles réversibles. Le clivage des longues molécules de pectines par des actions physicochimiques entraîne une baisse de viscosité de ces gels.

d) *Acidité.* — Les groupes carboxyles peuvent être titrés à un point d'équivalence de pH 8 avec des alcalis. Les pectines n'ont pas de constantes de dissociation bien définies. Les constantes apparentes calculées varient entre $0,1 \times 10^{-4}$ et 10×10^{-14} .

e) *Propriété absorbante.* — La poudre de pectine gonfle en absorbant l'eau d'une atmosphère humide. Elle ne se dissout qu'avec un excès d'eau. Les pectinates insolubles et les protopectines ne gonflent que très peu.

f) *Coagulation, précipitation.* — La pectine est précipitée d'une solution aqueuse par les solvants organiques tels que : l'alcool et l'acétone. Le degré de coagulation dépend beaucoup de la configuration de la molécule. La coagulation avec des cations polyvalents en nécessite d'autant plus (sels de Ca ou Na) que le poids moléculaire est bas et que l'estérification est forte.

g) *Dégradation par différents réactifs, enzymes et traitements.* — La molécule de pectine, soumise en solutions aqueuses à l'action d'agents chimiques (acides et alcalis) et physiques (chaleur) peut subir des modi-

fications de deux ordres : a) un clivage progressif de la longue chaîne en tronçons plus petits ; b) une déméthylation et une diacétylation plus ou moins poussées. Le schéma ci-après résume ces diverses réactions : (H. Cheftel) (25) (fig. 6).

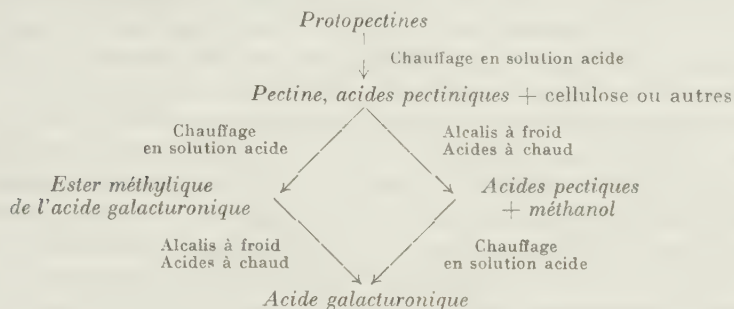


FIG. 6. — Dégradation physicochimique des substances pectiques.

Il faut noter qu'un court chauffage à plus de 100° C est plus nocif qu'un long chauffage à 80° C qui ne produit pratiquement pas de clivage.

Le clivage progressif obtenu par une ébullition prolongée d'une solution aqueuse de pectine est accompagné d'une augmentation correspondante du pouvoir réducteur.

Destruction par oxydation. — Les pectines sont facilement détruites par oxydation. Les produits oxydants sont la bromine, la chlorine. Les aci-réductones (acides ascorbique, réductone) oxydent la pectine rapidement, en présence d'oxygène ou de peroxyde d'hydrogène.

Destruction par irradiation. — Les rayons X et ultraviolets scindent la macromolécule des pectines.

Traitement mécanique. — Les macromolécules ne sont pas dégradées par agitation mécanique des solutions aqueuses de pectine. On observe seulement une baisse de viscosité momentanée. Des baisses de viscosité définitives ont été obtenues par précipitations alcooliques répétées ou par broyage excessif.

Dégradation enzymatique. — Ce chapitre sera discuté plus loin, rappe-
lons seulement qu'on divise ces actions en deux grands groupes : pectines méthylestérase et polygalacturonidase. Ces enzymes ont pour effet : la déméthylation et le clivage en tronçons plus petits de la macromolécule. La protopectinase est une enzyme hypothétique puisque le substrat lui-même n'est que peu défini.

LA PECTINOLYSE, ACTIVITÉ ESSENTIELLEMENT MICROBIENNE

La découverte des substances pectiques par Braconnot (16) en 1825, puis la confirmation de ce travail par Frémy en 1840 (44) ne devaient avoir leur importance dans l'explication de la pectinolyse que plus tard. A cette époque, en effet, les microorganismes n'étaient encore que des êtres issus de générations spontanées et sans pouvoir aucun. Cependant, Mitscherlich (101) dès 1850 attribue un rôle à un vibrion qui pullule lors de la pourriture expérimentale sous eau de la pomme de terre. Ces germes dit-il sont la cause de la séparation des cellules et, plus tard de la disparition de la cellulose. Trécul (164) (165), en 1865, établit, lui aussi, la présence de microorganismes au moment de la putréfaction des végétaux, mais il considère que ces organismes apparaissent spontanément sur les plantes en putréfaction. Il donne à ces végétaux extracellulaires les noms d'*Urocephalum* pour les formes en têtards, d'*Amylobacter* pour les formes renflées. Nylander (106) confirme la présence des microorganismes décrits par Trécul mais affirme qu'elles sont de nature bactérienne, laquelle exclut leur apparition par génération spontanée. Toutefois, il ne suppose pas que ces Bactéries puissent avoir un rôle dans la macération des plantes. Trécul (166) néanmoins reste sur ses positions et considère les plantules amylières comme issues de la transformation des cellules végétales.

Il faut attendre Van Tieghem (171), en 1877, pour retrouver l'idée de Mitscherlich attribuant un rôle évident aux microorganismes de la pourriture. Van Tieghem admet que les formes décrites par Trécul ne sont que les états successifs d'une seule et même espèce bactérienne qu'il dénomme *Bacillus amylobacter*. Il constate que c'est un germe anaérobie qui dissout les parois cellulaires mais laisse intactes les fibres celluloseuses de soutien. Toutefois, il assigne à son germe des propriétés cellulolytiques, fait dû probablement à l'impureté de ses souches. La même année, Prazmowski (124) reconnaîtra que les *Amylobacter* n'ont pas de pouvoir cellulolytique et n'attaquent que les matières pectiques.

Toutes ces découvertes devaient être bientôt coordonnées par les travaux antérieurs de Kolb (1868) (79) qui démontrait qu'au cours du rouissage, la matière gommeuse ou pectose, substance entourant les fibres celluloseuses, disparaît et, plus tard, par les travaux de Mangin (1888) (94) qui affirmait que la membrane cellulaire et les espaces intercellulaires contiennent, outre la cellulose, une grande quantité de matières pectiques.

Tous les éléments étaient, dès lors, réunis pour trouver l'explication du rouissage ou de la pourriture de certains végétaux, permettant ainsi aux microbiologistes d'isoler les microorganismes responsables. Dès le

début, des germes de toutes sortes sont isolés comme agents de la pourriture. Nous pouvons citer les travaux de de Bary (1886) (27) et de Ward (1888) (175) qui reconnaissent la nature de *Botrytis cinerea*, agent de la sclérose et de la pourriture de nombreuses plantes. On parle alors d'une « cytase » qui dissout la lamelle moyenne et les parois cellulaires des plantes envahies par les Champignons.

Nous avons vu que Van Tieghem dès 1877 découvre la nature bactérienne et anaérobie des germes du rouissage. Ceci devait se confirmer par l'école de Winogradsky où Fribs isole, en 1895 (45), le premier anaérobie en culture pure. Il le décrit comme bâtonnet sporulé à spore terminale, sans action sur la cellulose, mais rouissant des fragments de lin. Au cours de ce processus, l'auteur voit disparaître la majeure partie des substances dosables comme pectine. C'est la première fois que nous trouvons le nom de *Plectridium*.

Marmier (95) s'oppose aux travaux de Fribs car il prétend que le rouissage du lin est dû, non à des Bactéries anaérobies, mais à des aérobie. L'auteur ensemence du lin, baignant dans une eau alcaline, avec des fragments de lin rouis naturellement. Mais il n'isole et ne décrit aucun germe. Cette expérience est donc fort sommaire.

Wehmer (1898) (176) qui entreprend toute une série d'expériences sur la pourriture expérimentale des pommes de terre, se range du côté de Fribs. Lorsqu'il immerge les pommes de terre blessées, sous une couche d'eau elle-même recouverte d'huile, il constate que le germe dominant est un anaérobie : un *Plectridium* ; toutefois, lorsque la pourriture continue à l'air, une foule de microorganismes se met à l'œuvre : l'auteur cite entre autres : des *Micrococcus*, des *Streptococcus*, des *Proteus vulgaris* et des Champignons. Malheureusement, ces microorganismes sont décrits fort succinctement et le test de leur activité pectinolytique individuelle n'est pas clairement établi.

L'année 1899 apporte un premier pas dans la découverte du mécanisme intime de la pectinolyse. C'est Bourquelot avec Herissey (14) qui mettent les premiers en évidence une enzyme pectinolytique qui abaisse la viscosité d'une solution de pectine. Ils la nomment pectase et l'isolent de l'orge germée.

Retournons aux microorganismes parmi lesquels les découvertes de germes pectinolytiques s'accumulent. Potter, en 1899 (121), attire l'attention sur la pourriture molle de l'oignon. Le microorganisme responsable est un *Pseudomonas* qui détruit les lamelles moyennes et les parois cellulaires ; l'espèce n'est déterminée qu'en 1901 avec Foster (122), sous le nom de *Ps. destructans*. Laurent (1899) (86) pense que des germes banaux tels que *Bacillus coli communis* (*E. coli*) et *Bacillus fluorescens putidus* (*Ps. putida*) peuvent attaquer et pourrir les pommes de terre (digestion de la lamelle moyenne et des parois cellulaires) si

l'on fait des cultures répétées par passages successifs du germe sur des pommes de terre dont la résistance est atténuée par les alcalis. C'est aussi l'idée de Lepoutre (1902) (87) qui fait acquérir à des germes banaux, tels que : *Bacillus fluorescens liquefaciens* (Ps. *fluorescens*), *Bacillus mycoides*, *B. mesentericus*, une virulence à l'égard des tissus végétaux. Cette propriété disparaît à nouveau avec la culture sur bouillon.

En ce qui concerne *Bacillus fluorescens liquefaciens*, l'auteur distingue deux actions :

- 1) La dissolution des lamelles mitoyennes due à une diastase, variété de pectinase qui produit la dissociation des cellules ;
- 2) Une action coagulante puis nécrosante sur le protoplasme.

En 1901, Jones (65) va découvrir un véritable germe phytopathogène aérobie. Il est appelé chez un paysan dont la récolte de carottes a été entièrement détruite deux années de suite. Lors de la première récolte, le paysan s'aperçoit que quelques racines, sortant de terre, sont partiellement pourries ; néanmoins, il les entasse dans sa cave. Les carottes se mettent alors presque toutes à pourrir et il est obligé de les donner à ses bêtes ; dont le fumier servira à fumer le même champ où il replante encore des carottes. La récolte est, cette fois anéantie dès les premiers jours. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette virulence accrue la deuxième année. Mais il est certain que ce germe se trouvait dans le sol dès la première année. Jones isole une Bactérie qui se trouve pratiquement en culture pure, dans les racines pourries. C'est un bâtonnet Gram-négatif, mobile, asporulé, à ciliature péritriche. Les colonies sont blanches à contour irrégulier. Il fermente les glucides avec gaz, réduit et coagule le lait tournesolé, liquéfie la gélatine. Ce germe est anaérobie facultatif et produit indol et H_2S . Il ne supporte ni la lumière du soleil ni la dessiccation. L'auteur pense avoir à faire à une espèce nouvelle à laquelle il donne le nom de *Bacillus carotovorus* nv. spec. Nous sommes donc en présence du si classique *Erwinia carotovora*.

C'est la première fois que nous voyons un germe pectinolytique si bien décrit, avec des caractères précis. Dans tous les travaux précédents, nous ne savions jamais de quel germe il s'agissait véritablement. Quatre ans plus tard, Jones (66) fait mieux encore : ses expériences démontrent que *B. carotovorus* produit une enzyme (nommée pectinase) qui détruit les lamelles moyennes et d'autres composés pectiques. L'enzyme ne touche ni la cellulose, ni l'hémicellulose. Le principe d'une enzyme pectinolytique est ainsi énoncé clairement pour le monde bactérien. A la même époque (1902-1903) nombreuses sont les publications sur la pourriture des végétaux par des Bactéries ou des Cham-

pignons. *Botrytis cinerea* est à nouveau cité (Smith, 1902) (150). Harding (52), Harrison (53), Van Hall (170) traitent de la pourriture bactérienne de différentes plantes (entre autres : le chou). Van Hall (169) publie la même année un deuxième travail qui reprend la thèse de Laurent et Lepoutre selon laquelle des saprophytes banaux peuvent devenir phytopathogènes. Il s'aperçoit que, lorsque *B. subtilis* et *B. vulgatus* sont cultivés à une température minimum de 23° et 30° C, ils pourrissent différents tubercules par digestion de la lamelle moyenne et des parois cellulaires. Les propriétés pectinolytiques de *B. subtilis* sont donc mises en évidence. En 1902, nous voyons apparaître un premier travail qui nous donne quelques renseignements sur la pectinolyse dans le sol : Haumann (56) prélève des échantillons de lin rouis au sol et les ensemeince sur des milieux acides et alcalins en boîtes. Germes les plus couramment isolés : *Cladosporium herbarum*, champignon qui noircit les tiges, *B. coli*, *B. mesentericus*, *B. subtilis* et *Streptothrix forsteri* (Actinomycète) ; autres germes moins fréquents : *Bacillus fluorescens liquefaciens* et les Champignons *Penicillium glaucum* et *Cladosporium herbarum*. Il opère un rouissage *in vitro* avec les cultures pures de tous ces germes. Les Champignons sont les plus actifs, mais attaquent également la cellulose. Les plus beaux rouissages sont réalisés par *B. fluorescens*. Enfin, Haumann ensemeince les germes isolés sur des milieux gélifiés par le pectate (pectate de calcium, eau peptonée, phosphate d'ammonium, sulfate de potasse et de magnésie). Il constate une liquéfaction du gel par : *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *B. coli*, *B. fluorescens*, *B. subtilis* et *B. mesentericus*.

Haumann tire ces conclusions : le rouissage n'est pas dû à des agents spécifiques, mais tous les germes banaux de l'air et du sol en sont capables. Haumann va un peu loin dans ses affirmations, néanmoins, pour nous, l'important reste que, dès 1902, cet auteur ait reconnu comme pectinolytiques des germes du sol se classant parmi les ordres les plus divers : Champignons, Bactéries, Actinomycètes. Behrens (7), la même année, fait une étude détaillée sur les divers modes de rouissage et aboutit à des résultats similaires pour le rouissage au sol. Il isole surtout des Champignons : *Mucor stolonifer*, pectinolytique et cellulolytique donc néfaste pour le rouissage, *Cladosporium herbarum* seulement pectinolytique et *Mucor hiemalis* qui agit surtout lors du rouissage hivernal.

Behrens étudie encore le rouissage à l'eau et les germes anaérobies qui y pullulent, domaine que Haumann avait négligé ; il apporte quelques précisions sur un *Clostridium* capable d'attaquer les pectines extraites du chanvre ainsi que de divers glucides. Ce problème du rouissage par les anaérobies fait donc des progrès lui aussi. En 1904, Ome-lianski (108), travaillant avec l'école de Winogradsky étudie l'action du germe de Fribes sur le lin, comparé à celle du germe cellulolytique

qu'il avait isolé lui-même. Il montre par l'examen de coupes histologiques du lin, que le germe de Fribes digère la lamelle moyenne des cellules végétales. Beijerinck et Van Delden (9) (8) trouvent dans les eaux de rouissage, un anaérobie qu'ils dénomment *Granulobacter pectinovorum*. C'est un germe mobile, Gram-positif, à spores terminales, gélatinolytique. Il est capable d'attaquer les protéines végétales, ce qui expliquerait son accumulation sur les tiges de lin en cours de rouissage. Il concurrence ainsi aisément les autres butyriques ordinaires (*Cl. butyricum* Prazmowski) qui ne peuvent croître qu'avec de l'azote soluble. Comme ce germe est à spores terminales, il faut le ranger, de même que Fribes l'avait fait, dans le genre *Plectridium*. La première description complète de *Plectridium pectinovorum* qui avait été très sommairement étudiée auparavant par Fribes (1895) peut donc être attribuée à Beijerinck et Van Delden (A.-R. Prévot (130) et Raynaud (134)). Stoermer (159), la même année (1904), fait une étude d'ensemble du rouissage du lin à l'eau. Il décrit les modifications histologiques et chimiques de la plante au cours du processus. Il donne une technique d'isolement sur plaques de gélatine, permettant d'obtenir des cultures pures. Il énonce les caractères du germe responsable du rouissage qu'il appelle *Plectridium pectinovorum*. La description du germe est très détaillée, ce qui permet de l'identifier avec *Granulobacter pectinovorum* de Beijerinck et Van Delden. D'après tous ces auteurs, c'est le germe le plus répandu et le plus actif, lors du rouissage à l'eau. Nous verrons, par la suite, que cette conception varie avec les écoles et la région où est effectué le rouissage.

Clostridium polymyxa avait déjà été trouvé en 1880, par Prazmowski (125) qui n'avait pas alors reconnu son activité pectinolytique. Il faut attendre 1903, avec les travaux de Beijerinck et Van Delden (9) et le travail d'Ankersmit (3) en 1906, pour voir mentionner le pouvoir pectinolytique de ce germe. Beijerinck et Van Delden rencontrent très souvent cette bactérie dans le sol. Ankersmit l'isole de l'intestin du veau. Tous trois la nomment *Bacillus asterosporus* mais l'on sait aujourd'hui que c'est une synonymie de *Cl. polymyxa*. C'est à la même époque (1905) que Schardinger (145) découvre un germe très voisin de *Cl. polymyxa* : il en fait une description fort détaillée. Il conclut à une espèce nouvelle qu'il appelle *Bacillus macerans* (*Clostridium macerans*). L'auteur l'a trouvée comme souillure dans une bouillie de pommes de terre stérilisée à l'autoclave. Le nom de cette bactérie actuellement bien connue indique que ce germe possède un puissant pouvoir macératoire.

Le début du siècle marque un tournant décisif dans l'histoire de la pectinolyse car les Bactéries découvertes sont décrites avec précision. Le pouvoir pectinolytique est testé sur des substrats définis. Ainsi, presque chaque année de ce siècle verra sortir une espèce pectinolytique nou-

velle ou la description du pouvoir pectinolytique chez des germes déjà décrits : Giacomma et de Grazia (1906) (48) mentionnent l'activité macérateur de *Bacillus comesii* qu'on sait maintenant identique à *B. pumilus* (*B. mesentericus*). Une nouvelle espèce d'*Erwinia*, *E. aroideæ*, est étudiée par Rossi et Carbone (1908) (139). Jones (1909) (67) fait de même pour *E. solaniperda*. Les travaux sur le rouissage continuent cependant. En 1916, Carbone (22) marque un pas décisif en isolant, des boues de routoirs à chanvre de Bologne, un anaérobie pigmenté nommé par lui : *Clostridium felsineum*. Il le présente d'abord comme aérobie car il peut pousser en présence d'air lorsqu'il est associé à des organismes aérobies. Sa nature anaérobie fut découverte, un an plus tard, par Carbone et Tombolato (23). Nous verrons que, par la suite, toute une série d'anaérobies pigmentés a été trouvée au cours du rouissage. Citons dès maintenant : *Cl. maymonnei*, isolé par les mêmes auteurs et qui est une variété biochimique de *felsineum* : il ne produit ni acétone, ni aldéhyde mais du propanol, de l'isopropanol, de l'isobutanol et les acides propionique et butyrique.

Les Champignons augmentent la série des agents phytopathogènes, ils se situent aussi bien dans les Champignons supérieurs que chez les inférieurs. Brown (1915, 1916, 1917) (19) mentionne parmi les *Pezizales* : le genre *Sclerotinia* avec *S. cinerea*, *S. minor*, *S. fructigena*, ainsi que le classique *Botrytis cinerea*. Zeller (1916) (188) reconnaît même une activité pectinolytique chez un Basidiomycète (Polysporales) *Lenzites sepiaria*, de même que Mayo (97) pour *Stereum purpureum* ; avec les Champignons inférieurs, nous avons les noms de *Mucor racemosus*, *M. stolonifer*, *M. piriformis*, *M. hiemalis* (Harter, 1925) (54). Le genre *Rhizopus* fournit quelques espèces (Harter Weimer, 1923) (55) : *R. nigricans*, *R. tritici*, *R. artocarp*i, *R. chinensis*, *R. microsporus*, qui sont toutes pectinolytiques.

1923 voit apparaître le premier travail précis sur la fonction pectinolytique dans le sol. Düggeli (35) reconnaît l'importance que doit avoir cette fonction dans le sol et, à cet effet, réalise un milieu pour la numération des germes pectinolytiques du sol. Dans des tubes contenant une solution saline, il immerge de petits cubes de pommes de terre. Selon lui, la présence de germes pectinolytiques se manifeste d'après le dégagement gazeux ou la décomposition du morceau de pomme de terre. On s'aperçoit d'emblée, que seule la désagrégation du cube est valable car le dégagement gazeux peut provenir aussi de la présence d'un germe amylolytique. Néanmoins, l'auteur arrive, grâce à cette technique à des conclusions qui semblent en partie justes. Il étudie toute une série de sols de forêt. Les germes les plus fréquemment isolés sont des Bactéries et parmi les plus courantes : *Bacillus amylobacter*, *Bacillus asterosporus*, *Bacillus macerans*, et d'autres Bac-

téries du foin et de la pomme de terre. *Bacillus amylobacter* correspond à *Clostridium butyricum* qui n'est pas pectinolytique. Le plus frappant est l'absence de Champignons et la dominance de germes anaérobies facultatifs, fait facilement explicable par l'emploi de tubes minces et d'un milieu liquide ; les Bactéries y poussent rapidement avec dégagement gazeux, rendant le milieu impropre à la culture des Champignons, plus lents.

Pour 10 échantillons de forêts de sapins, Düggele trouve de 1 000 à 100 000 germes pectinolytiques par gramme de sol ; 100 000 pour des forêts de sapins à sol neutre, 1 000 à 10 000 pour des sols acides. Dans 9 échantillons de forêts de hêtres, l'auteur compte de 1 000 à 1 million de pectinolytiques ; le pH ne semble pas ici jouer de rôle. Pour 6 sols de montagne, le nombre de pectinolytiques varie également beaucoup : de 100 à 1 million. Les chiffres inférieurs correspondent à des sols de montagnes peu évolués. Le nombre de pectinolytiques diminue avec la profondeur du prélèvement pour un sol donné ; de la surface jusqu'à 40 cm, il est de 100 000, de 10 000 jusqu'à 166 cm et seulement de 2 à 266 cm. Pour les types de terres suivants, Düggele indique ces chiffres fort intéressants :

Terre de jardin	535 000
Terre de vignoble	85 000
Terre de culture	70 000
Prairie	235 000
Marécage	3 700

De ce travail approfondi, nous retiendrons la fréquence de *Cl. polymyxa* et de *macerans*, ainsi que le comportement des Bactéries pectinolytiques qui ne diffère pas de celui des autres germes : très nombreuses dans les sols riches (jardin) et en surface, elles diminuent avec l'appauvrissement du sol et sa profondeur. Il faut tenir compte cependant de la déficience de la technique employée qui, dans bien des cas, a pu donner des résultats erronés.

Stöckli, 5 ans plus tard, reprendra le même procédé pour analyser les excréments de vers de terre en comparaison avec les terres elles-mêmes ; le tableau I résume ses expériences.

Selon l'auteur, l'augmentation des pectinolytiques dans les excréments de vers de terre serait due à une augmentation d'humus qui favoriserait ce groupe. Il en ressort donc que les pectinolytiques réagissent de la même manière que les autres groupes de Bactéries du sol ; la richesse des pectinolytiques dans les terres de jardin vient encore confirmer ce fait.

TABLEAU I. — Nombre de pectinolytiques par gramme.

Moyenne de 6 échantillons pour chaque type de sol	Témoin (terre)	Excréments de vers de terre	Différences en %
Terre de jardins	1 041 500	1 428 090	+ 37
Prairies	162 600	1 050 000	+ 546
Prairies	129 162	482 400	+ 274
Prairies de forêt	123 100	351 300	+ 181
Forêt avec divers arbres . . .	4 070	63 310	+ 1 455
Forêt de sapins	57 733	161 700	+ 76

Parallèlement aux recherches sur les différents microorganismes pectinolytiques, les biochimistes s'intéressent à la constitution même de la pectine. Ceci était de première importance pour comprendre le mécanisme enzymatique de la pectinolyse. C'est principalement à Ehrlich (1932) (38) (39) que l'on doit l'étude de la molécule de pectine et les premiers travaux précis sur les enzymes pectinolytiques. Ehrlich constate d'abord que l'hydrolyse de la molécule de pectine par la chaleur donne principalement des acides *d*-galacturonique et di-, tri- et tétra-*d*-galacturonique. La molécule de pectine est construite surtout avec des maillons d'acides *d*-galacturonique. Ehrlich distingue deux sortes de pectine : une « Pektolsäure » qui peut s'apparenter à l'acide pectique, insoluble dans l'eau, avec une rotation optique spécifique $[\alpha]_D$ de $+290^\circ$, et une « Pektolactonsäure », se rapprochant des pectines, soluble dans l'eau, dont la rotation spécifique est $+250^\circ$. Sur les deux sortes de substances pectiques, il fait agir les extraits enzymatiques les plus divers : takadiastase, sécrétion intestinale d'*Helix pomatia*, extrait d'orge germé, ce qui nous montre la large répartition des enzymes pectiques dans le monde vivant : plantes supérieures (orge), mollusque (*Helix pomatia*), enfin microorganismes, ici les Champignons. Ehrlich fait surtout l'étude enzymatique détaillée des enzymes de *Penicillium glaucum* et *ehrichii*. Il les extrait du mycélium en broyant celui-ci avec du toluol et il sépare le liquide obtenu par centrifugation ; le liquide sans mycélium est ensuite mélangé avec 4 fois son volume d'alcool. Le précipité recueilli est récolté par centrifugation, lavé à l'alcool et l'éther, enfin séché sous vide avec CaCl_2 . La préparation enzymatique est assez grossière et peu purifiée, mais très active sur les différentes pectines. Elle abaisse le pouvoir rotatoire de la pectine de 280° à 50° . En même temps, la réaction rouge augmente en présence de plomb, ce qui indique une libération d'acide *d*-galacturonique. Ehrlich prouve donc qu'il

s'agit bien là d'une enzyme qui coupe la chaîne de pectine en tronçons plus petits : il la nomme *pectolase*. L'enzyme est active à pH 5 surtout et à 30° C, inactive au-dessus de pH 6,5 et de 50° C. Le terme de pectolase est actuellement périmé, il est remplacé par celui beaucoup plus précis de *polygalacturonidase*. Néanmoins, en 1932, Ehrlich reste le premier à avoir découvert le groupe d'enzymes le plus important pour la démolition de la molécule de pectine.

Kertesz (75) en 1936, dans un travail de base, réunira les premières données sur les enzymes de la pectinolyse. On pensait alors qu'il en existait de trois sortes :

La protopectinase ;

La pectinase ;

Et la pectase ou pectineméthoxylase.

La protopectinase est une enzyme mal définie car le support lui-même, la propectine, l'est aussi.

Pour Kertesz, il n'existe pas qu'une pectinase, mais ce nom grouperait plutôt plusieurs enzymes ; pectinase est un terme peu précis qui peut provoquer toutes sortes de malentendus. Dans le groupe des pectinases, rentre l'enzyme d'Ehrlich : la pectolase. Kertesz lui applique un autre terme plus précis, celui de polygalacturonase. Or, nous verrons qu'actuellement cette appellation a complètement remplacé celle de pectinase.

La pectase nommée aujourd'hui pectine méthylestérase, qui déméthyle la pectine, avait été découverte par Tutin en 1922 (163). Cet auteur l'avait extraite d'un jus de trèfle : l'enzyme forme de l'acide pectique et de l'alcool méthylique à partir de la pectine.

La liste des microorganismes pectinolytiques s'allonge toujours. Avec Ehrlich et son étude enzymatique nous avons vu apparaître le genre *Penicillium* avec les espèces *P. ehrlichii*, *P. glaucum*, *P. luteum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. notatum*. Dans le genre voisin *Aspergillus*, Grassman (1933) (49) (50) reporte les noms bien connus d'*A. niger* et d'*A. oryzae*. Menon (1934) (98) cite quelques espèces pectinolytiques dans le genre *Fusarium* très répandu dans la nature ; ce sont : *Fusarium niveum*, *F. lycopersici*, *F. chromiophoron*, *F. fructigenum* et, parmi les Ascomycètes : *Glomerella cingulata*. Presque toutes ces espèces ont été isolées comme phytopathogènes, dissolvant la lamelle moyenne des végétaux et pénétrant ainsi dans les cellules-hôtes. Nous additionnerons à cette liste déjà longue les noms de *Pythium debaryanum* (Pitman, Cruess, 1929) (118), *Phytophthora erythroseptica* (Chona, 1932) (26), *Bissochlamys fulva* (Ascomycète) (Olliver, Rendle, 1934) (107) et des espèces de *Polyporus* parmi les Basidiomycètes (Bose, 1938) (13). En quittant la phytopathologie nous retombons dans le rouissage :

autre sujet favori de la littérature pectinolytique. Ruschman et Bartram (140) nous fournissent une nouvelle étude du rouissage du lin au sol et à l'eau. Les Champignons sont des organismes actifs au cours du rouissage au sol. Le plus fréquent est *Alternaria tenuis* mais celui-ci est également cellulolytique, il attaque en même temps les fibres mêmes. Les autres espèces pectinolytiques sont : *Monilia sitophila*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium* sp., *Penicillium luteum*, *Mucor plumbeus* et des *Rhizopus*. Pour le rouissage à l'eau, *Bacillus felsineus* (*Clostridium felsineum*), *Granulobacter pectinovorum* (*Plectridium pectinovorum*) et *Bacillus asterosporus* (*Clostridium polymyxa*), sont les espèces actives. Ce sont donc des germes courants, bien connus et que nous retrouverons à maintes reprises, au cours de l'étude du rouissage. Des échantillons de Buenos Aires, et du lin argentin rouis au laboratoire, Sordelli et Soriano (1928) (154) isolent aussi : *Bacillus felsineum* en grande quantité, à l'exclusion de tout autre pectinolytique. Le pouvoir rouissant de *B. felsineus* est excellent ; il laisse des fibres très claires et complètement dégagées. La technique d'isolement est la suivante : les auteurs procèdent d'abord à des enrichissements sur purée de pommes de terre et isolent le germe sur gélose au jus de carottes. Ce germe si courant au cours du rouissage a préoccupé bien d'autres chercheurs, notamment Kluyver et Orla-Jensen (1939) (109), qui examinent la microflore du rouissage du lin hollandais à l'eau chaude. Ils isolent exclusivement le germe de Carbone : *Bacillus felsineus*. C'est un anaérobie qui donne de très belles fibres claires. Ces auteurs mentionnent cependant que cette bactérie appartient bien au genre *Clostridium* défini par Prazmowski et le nomme *Clostridium felsineum* tout comme l'avait déjà fait Donker en 1927. Les apports de Ruschmann et Bartram, en 1942 (141), sur le rouissage vont couronner tous les travaux sur *felsineum* en précisant sa biologie et son écologie. Le milieu employé, pour le mettre en évidence est une gélose glucosée additionnée d'extrait de levure. *Bacillus felsineus* comme le nomme encore ces auteurs se rencontre dans tous les rouissages à l'eau chaude (35°-40° C), mode de rouissage dont on commençait à se servir dans cette période. *Felsineum* produit de très belles fibres, claires et bien dégagées. Par contre, lorsqu'on abaisse la température de rouissage entre 20° et 25° C, ce germe disparaît totalement, laissant la place à *Granulobacter pectinovorum* (*Plectridium pectinovorum*). C'est ainsi que, lors du rouissage à froid naturel dans les rivières froides telles que la Lys en Belgique et d'autres rivières allemandes, les auteurs n'isolent aucun *felsineum* mais toujours *Pl. pectinovorum*. Ce dernier donne un rouissage beaucoup plus lent, avec des fibres mal dégagées et foncées. *Clostridium felsineum* est donc un habitant des eaux chaudes et il n'est pas étonnant, concluent les auteurs, qu'il ait été

trouvé avant tout par l'école italienne (Carbone) et celle d'Amérique du Sud (Soriano). Alors s'expliquent bien des contradictions sur la prédominance de tel ou tel germe lors du rouissage : tout dépend de la température. Si ces deux espèces sont les Bactéries dominantes du rouissage à l'eau, elles ne sont cependant pas les seules. En 1930, Soriano (155) doit isoler une espèce nouvelle anaérobie et pigmentée en orangé dans les eaux et les boues de routoirs à lin australiens. Il la nomme *Bacillus haumanni*. C'est en 1938 que A.-R. Prévot (130) reconnaîtra sa nature clostridienne. Contrairement à *felsineum*, il ne possède pas de gélatinase. McCoy et McClung (93) décrivent un *Clostridium* pigmenté en rose : *Cl. roseum*. Ce germe est un rouisseur excellent, qui fermente violemment la pomme de terre, détruisant les lamelles moyennes et les parois cellulaires. Il a été d'abord isolé par Andrew's sur les tiges de maïs allemand, puis dans les sols d'Afrique tropicale. C'est un ferment très protéolytique puisqu'il attaque la gélatine, la caséine et le blanc d'œuf. Les acides formique et butyrique sont principalement les produits de fermentation terminaux. *Cl. felsineum* ne produit que les acides acétique et lactique.

Avant de continuer l'énumération de nouvelles espèces anaérobies, nous devons nous arrêter sur un problème nouveau qui commence à préoccuper divers auteurs autour de 1940 : c'est celui de la digestion de la pectine par les Vertébrés. Les chercheurs s'assurent d'abord que les animaux étudiés ne possèdent pas d'enzyme pectinolytique propre et aucune trace de pectine n'étant retrouvée dans les excréments concluent que la digestion de la pectine ingérée est effectuée par des microorganismes du tube digestif. Baker (5) étudie la microflore pectinolytique du cæcum de lapin et de cobaye. Il isole des Streptocoques, des *Bacillus* et des *Clostridium* pectinolytiques ; hélas, l'auteur n'effectue aucune détermination précise pas plus qu'il ne détermine la fréquence de chacun des groupes. Werch, Jung et Day (178) nourrissent des chiens, préalablement mis à la diète avec des bouillies à base de pectine de citron. Ilsensemencent le milieu suivant : peptone, 1 % ; pectine, 1 % ; gélose, 1 %, additionné d'un indicateur de pH, avec les excréments (aucune trace de pectine ne peut être décelée dans ceux-ci). Les géloses sont coulées sur boîtes de Petri en aérobose ; les auteurs font donc déjà abstraction des anaérobies stricts. Les colonies produisant un virage acide de l'indicateur sont isolées comme pectinolytiques. Nous verrons plus tard que ce test est radicalement faux et ne saurait indiquer qu'une activité secondaire pectine-estérasique. Nous pensons, de plus, que le choix de l'animal est peu propice car il va de soi que ce sont les animaux végétariens qui ingèrent naturellement le plus de pectine. Les souches les plus fréquemment isolées sont des *Aerobacillus* (3), des *Micrococcus*, des *Enterococcus*. Aucune déter-

mination précise d'espèces. Ces souches sont testées pour leur pouvoir pectinolytique par viscosimétries des solutions de pectine. Toutes les souches abaissent très peu ou pas la viscosité et seuls les *Aerobacillus* et les *Micrococcus* fermentent l'acide galacturonique. Toutefois les auteurs pensent que ce sont bien les germes responsables de la pectinolyse. Notre conclusion est que, avec des méthodes d'isolement impropres et en négligeant les anaérobies, ils sont passés à côté du problème.

La période de 1940 à 1950 continue et améliore les recherches entreprises auparavant. Dans le groupe des Champignons phytopathogènes, on allonge encore la liste des pectinolytiques mais les travaux portent surtout sur leur enzymatique. Du côté du rouissage, des espèces anaérobies nouvelles sont isolées et M. Raynaud, par un magnifique travail, rassemblera toutes ces données. Les Bactéries aérobies font l'objet d'une étude particulière : de nombreuses souches de collections, de préférence phytopathogènes, sont testées sur des milieux nouveaux, pour connaître leur pouvoir pectinolytique. Quant à la microbiologie du sol, elle reste toujours à l'arrière-plan, mis à part une première lueur avec le nouveau milieu de Wieringa.

Reprenons en détail ces travaux :

Dowson (32) (33), qui étudie le rouissage *in vitro* à une petite échelle, assure que *Bacillus polymyxa* est l'hôte principal des fibres de lin. Ce germe fermente énergiquement la pomme de terre, la réduisant en bouillie. Précisons que ces résultats ne sont valables que dans les conditions d'expérimentation de l'auteur, car, comme nous l'avons déjà vu, ce germe n'est que très peu souvent isolé, au cours de rouissages naturels et industriels. Dowson avec Volcani (173) isolent cette bactérie comme cause de lésions noirâtres dans les piments (*Capsicum annuum*). *Cl. polymyxa* peut donc être un parasite occasionnel des plantes. Allen (1944) (2) entreprend une étude de la microflore des bacs de rouissage du lin. C'est le premier auteur qui procède à des numérations. Pour ce faire, il ensemence des dilutions du liquide de rouissage sur des milieux salins contenant des tranches de pommes de terre (le ramollissement indique la présence de pectinolytiques). Les différents bacs de rouissage contiennent de 10^4 jusqu'à 10^8 germes par millilitre de liquide ou par gramme de tiges broyées. L'isolement indique une dominance des anaérobies sporulés (pas d'espèces précises). Mais, indique Allen, les aérobies sporulés sont également présents, entre autres : *B. subtilis*. Au laboratoire, *B. subtilis* rouit complètement le lin en trois jours et ramollit entièrement la pomme de terre ; il participe d'une manière efficace au rouissage.

Le groupe des anaérobies stricts pectinolytiques chromogènes s'agran-

dit, grâce surtout aux travaux de l'École française. Nous connaissons déjà *Cl. felsineum*, *haumannii*, *maymonei*, *roseum*. M. Raynaud et A.-R. Prévot (126) ajoutent à cette liste un *Clostridium* produisant un pigment rouge corail (nommé corallinine), de nature complexe. Il est très répandu puisqu'on l'a isolé dans les boues d'Afrique tropicale et dans les poussières de Paris. Pour le classer, il fallait choisir entre deux groupes taxonomiques de *Clostridium* : l'un, le groupe des pectinolytiques chromogènes, l'autre, qui comprend des *Clostridium* chromogènes ou non. Les auteurs étudient les propriétés pectinolytiques éventuelles de cette bactérie. Sur pectine commerciale, les résultats sont négatifs ou douteux mais, sur tiges de lin, on obtient un rouissage excellent. Il se place donc dans le sous-groupe des *Clostridium* pectinolytiques chromogène. Son pigment rouge corail, la forte production d'amines et l'absence de formation d'acétoïne le distinguent aisément des germes voisins.

A.-R. Prévot en 1946 (127) isole également des boues d'Afrique tropicale, un germe voisin de *Corallinum*. Son pigment est rouge saturne à 30° C. A 37° C, il n'y a pas de pigmentation. Il se différencie de *Corallinum* par l'absence de gélatinase et son pouvoir rouissant beaucoup plus faible. Il porte le nom de son pigment : *Clostridium saturni-rubrum*.

La découverte de *Plectridium virens* dans les boues végétales d'un étang, toujours par le même auteur (128) devait confirmer davantage encore que les anaérobies stricts ne sont pas seulement les hôtes des fibres textiles. Ils détruisent les substances pectiques de nombreuses plantes aquatiques. Ce fait est d'autant plus net que ces germes ne poussent souvent qu'en présence de décoction végétale (pour *Pl. virens*, les décoctions de *Lemna minor* sont très favorables). Cet anaérobie se distingue aisément de *Plectridium pectinovorum* par son pigment vert et des autres anaérobies pigmentés par sa spore rigoureusement terminale qui en fait un *Plectridium* et non un *Clostridium*.

Clostridium aurantibutyricum nous vient encore d'Afrique tropicale. Il a été isolé sur des souches d'*Hibiscus* par Weizmann, mais c'est Hellingner (1947) (58) qui en fait l'étude systématique détaillée. La pigmentation rouge orange, la gélatinase, la pectinolyse (très énergique pour ce germe), la production d'acétone, de butanol, d'acide butyrique et acétoïne comme produits de fermentation, sont les points communs avec *felsineum* et *roseum*. Mais ce germe se distingue des deux espèces par les caractères suivants : ne fermente pas l'inuline, ne réduit pas les nitrates en nitrites, donne moins de composés neutres à la fermentation, ne digère pas les tranches de pommes de terre, enfin sa température optima de croissance est de 30° C et non de 37° C. Toutes ces données justifient donc la distinction en espèce nouvelle.

La découverte de tous ces anaérobies stricts pectinolytiques, surtout pigmentés, appelait un travail d'approfondissement et de récapitulation. C'est M. Raynaud (134) qui, en 1949, s'intéressa le premier à la question d'ensemble de ces Bactéries et posa la pierre de base de ce groupe. L'auteur reprend d'abord tout l'historique de la question pour chaque germe, puis réétudie et décrit chacun de ceux-ci, résumant dans le tableau II leurs caractères principaux.

TABLEAU II

	<i>Pl. pectinovorum</i>	<i>Cl. felsineum</i>	<i>Cl. haumani</i>	<i>Cl. roseum</i>	<i>Cl. corallinum</i>	<i>Cl. saturnirubrum</i>	<i>Cl. aurantibutyricum</i>
Pigment :							
Couleur	o	Orangé jaune ou rose	Jaune canari ou rouge	Rose	Rouge corail	Rouge saturne	Orangé ou rouge
Influence de l'air.	o	o	o	o	+ pas de pigment sans air	o	o
Gélatine	+	+	o	+	+	o	+
Lait	+	+	?	+	+	o	+
Indol	o	+	?	o	o	o	+
SH ₂	o	+	?	o	o	o	o
Acétyl-méthyl-car- binol	o	+	?	+	o	o	+
Acide butyrique . .	+	+	?	+	+	o	+
Acide acétique . .	+	+	?	+	+	o	+
Acide formique . .	±	±	?	+	+	o	+
Acide lactique . .	+	+	?	+	+	+	±
Butanol	+	+	?	+	+	?	+
Éthanol	+	+	?	+	+	?	+
Acétone	+	+	?	+	+	?	+
Isopropanol . . .	+	± ou o	?	o	o	?	±
Température opti- ma	37°	37°	37°	37°	37°	26°	30°
Milieux à base de viande	+	o ou +	o	+	+	+	o
Amidon	+	o ?	o	+	+	+	+
Inuline	±	o	?	+	+	o	o
Glycérol	±	o	?	o	+	o	o
Sorbitol	+	o	?	?	+	o	o

Raynaud passe ensuite à la recherche de la pectinolyse de chacun des germes. Les enzymes suivantes sont testées : protopectinase, polygalacturonidase et pectine-estérase. Les difficultés techniques sont grandes surtout pour l'étude des deux premières enzymes, car l'action de la chaleur (nécessaire pour la stérilisation) et l'action des alcalis (nécessaires pour la neutralisation) dépolymérisent la chaîne de pectine : la viscosité diminue alors fortement et il n'est plus possible de mesurer l'attaque de la pectine par la perte de viscosité. M. Raynaud a tourné la difficulté par l'emploi de bactéries en resting, mises en présence de solution de pectine non stérilisée. L'étude de la pectinolyse peut également se faire par des dosages de la pectine. Les taux d'attaque de la pectine sont les suivants (technique de dosage de Hinton) :

	Pectine attaquée en % (maximum)	pH après culture
<i>Cl. sporogenes</i>	0	6,4
<i>Pl. pectinovorum</i> 3723	39	6,4
<i>Pl. pectinovorum</i> PJ	24	6,2
<i>Cl. corallinum</i> TR	15	6,3
<i>Cl. aurantibutyricum</i>	100	4,2
<i>Cl. roseum</i>	13	5,2
<i>Cl. felsineum</i> (3220).....	21	5,7
<i>Cl. saccharobutyricum</i> GR4	0	6,0
<i>Cl. saturnirubrum</i>	9	5,8

Nous voyons que *Cl. aurantibutyricum* est un pectinolytique très énergique, produisant une forte acidité du milieu. Vient ensuite *Pl. pectinovorum*, puis *Cl. felsineum* et les autres anaérobies pigmentés. Ces derniers ne fermentent que peu ou pas la pectine malgré un rouissage net des plantes textiles. Pour tous ces germes (sauf *aurantibutyricum*), nous noterons que l'attaque de la pectine ne correspond pas à la baisse de pH ; ainsi, *Cl. sporogenes*, non pectinolytique et *Cl. saccharobutyricum* abaissent plus le pH que *Pl. pectinovorum*. M. Raynaud a également étudié la fermentation de l'acide galacturonique.

Les germes sont cultivés sur un milieu à base de galacturonate. Ce dernier est dosé par son pouvoir réducteur :

	Attaque du galacturonate en %	pH final
<i>Cl. aurantibutyricum</i>	100	4,8
<i>Cl. saturnirubrum</i>	4	5,5
<i>Cl. corallinum</i>	0	6,4
<i>Cl. roseum</i>	0	6,4
<i>Cl. felsineum</i>	0	6,4
<i>Pl. pectinovorum</i> 3723	100	4,9
<i>Pl. pectinovorum</i> PJ	100	4,7
<i>Cl. saccharobutyricum</i> GR4.....	54	5,5
<i>Cl. sporogenes</i>	0	6,4

On peut déduire qu'il n'y a pas forcément concordance entre pectinolyse et attaque de l'acide galacturonique, mais que cette dernière est en relation directe avec la baisse de pH.

Le rôle de *Cl. felsineum* dans le rouissage devait être précisé davantage encore par Soriano (156) puis par Lanigan (83). Le premier auteur affirme que l'analyse des routoirs industriels et semi-industriels (en cuve à chaud) d'Argentine, du Chili, de Hollande et de Belgique lui fournissent *Cl. felsineum*, à l'exclusion de tout autre rouisseur ; mais, fait contradictoire avec les découvertes de Ruschmann et Bartram, un échantillon de la Lys ne contient également que ce germe. Ce serait dit-il l'explication de la bonne qualité des fibres obtenues dans cette rivière. Peut-être l'auteur a-t-il fait son prélèvement dans une saison chaude alors que les deux précédents avaient opéré par un temps plus froid. Cette hypothèse semble vraisemblable. Lanigan qui compare le rouissage du lin australien avec le lin belge arrive aux mêmes conclusions : *Cl. felsineum* est abondant dans les routoirs belges, qui de ce fait produisent d'excellentes fibres, alors que les fibres australiennes sont mauvaises à cause de l'absence de cette bactérie.

Nous verrons, dans la prochaine décade, que la question des anaérobies pectinolytiques est loin d'être terminée en 1949.

Pour les Bactéries aérobies, la période de 1940 à 1950 est marquée par une nouvelle série d'expériences. En effet, les différents chercheurs s'intéressent, de plus en plus, au mécanisme de pénétration des phytopathogènes au sein d'une plante et étudient pour cela le pouvoir pectinolytique de nombreuses souches de collections. La viscosimétrie est devenue le moyen le plus répandu pour détecter la pectinolyse. Les auteurs mettent au point différents milieux gélifiés par la pectine. Nommons celui de G. E. Jones (63) qui est d'une extrême complication, surtout en ce qui concerne la préparation, et celui de D. R. Jones (62). Tous reposent, en général, sur la propriété gélifiante du calcium vis-à-vis des pectines partiellement déméthylées. A. E. Oxford (1944) (110) teste 36 souches de *Pseudomonas* phytopathogènes de collection sur un milieu de sa composition. Sur les 36 souches testées, toutes pousent très bien, mais 6 seulement liquéfient le gel de pectine.

Ce sont :

- Ps. mors-prunorum* (1 souche sur 8) ;
- Ps. syringæ* (2 souches sur 8) ;
- Ps. marginalis* (très actif) (1 souche sur 1) ;
- Ps. cerasi* (1 souche sur 1) ;
- Ps. tabaci* (1 souche sur 1).

Les souches inactives appartiennent aux espèces : *Ps. fluorescens* (7 souches), *Xanthomonas pruni* (1), *Bacterium tumefaciens* (2), *Ps. pha-*

seolicola (1), *Ps. syringæ* (les 6 autres souches) et *Ps. prunicola* (2).

Ce dernier germe a fait l'objet d'une étude spéciale par Mills (100). *Ps. prunicola* sécrète, en effet, une pectine-estérase. C'est une exo-enzyme formée adaptivement en présence de pectine et d'acide galacturonique. La préparation enzymatique de Mills scinde 75 % des groupes méthoxyles ; elle n'a pas d'action sur l'éthylacétate, l'éthyloxalate, le méthylester de l'acide α -méthylgalacturonique. C'est donc une enzyme rigoureusement spécifique de la pectine. Pour mettre en évidence l'activité pectine estérasique, l'auteur emploie une méthode manométrique. Reid (135) à la même époque préconise la technique ci-dessous (test de diffusion) pour la recherche des pectine-estérases : dans un milieu coulé sur plaque, solidifié par de la gélose et de la pectine, on creuse un godet. On place dans celui-ci des corps bactériens jeunes et lavés. Si l'enzyme est présente, l'indicateur (rouge de méthyle) inclus dans le milieu, vire du jaune au rouge. D. R. Jones (62) dont nous avons déjà mentionné le milieu examine les microorganismes suivants qui sont tous fortement pectinolytiques :

Bacterium phytophthorum ;

Bacillus carotovorus ;

Bacillus aroideæ ;

Bacillus polymyxa ;

Bacillus subtilis ;

ne sont pas pectinolytiques :

Bacterium aerogenes ;

Bacillus mesentericus ;

Ps. fluorescens.

Burkholder et Starr (20) constituent une liste de germes beaucoup plus longue. Aucun des *Pseudomonas* phytopathogènes examinés n'est pectinolytique, conclusion d'autant plus étonnante que *Ps. alliicola* et *Ps. solanacearum* provoquent tous deux une pourriture molle de l'oignon. Nous reportons ici la liste des *Pseudomonas non pectinolytiques* étudiées : *Ps. aceris*, *alliicola*, *angulata*, *apii*, *aptata*, *atrofaciens*, *barkeri*, *berberidis*, *caryophilli*, *delphinii*, *glycinea*, *lachrymans*, *lapsa*, *mori*, *papulans*, *savastoni*, *syringæ*, *tabaci*, *tomato*, *tonelliana*, *viridilicida*, *washingtonia*, *striafaciens*, *viburni*, *cichorii*, *coronofaciens*, *maculicola*, *marginata*, *mellea*, *phaseolicola*, *pisi*, *primulæ*, *ribicola*, *ribes*, *sesami*, *woodsii*, *aceris*, *viburni*, *solonacearum*. Par contre, les auteurs constatent que la moitié des souches du genre *Xanthomonas* liquéfient la pectine, ce sont : *X. barbarea*, *campestris*, *carotæ*, *geranii*, *incanæ*, *lespedezæ*, *manihotis*, *papavericola*, *pelargonii*, *phaseoli* var. *sojensis*,

taraxaci (douteux), *vascularum*, *vesicatoria*, *vesicatoria* var. *raphani*, *vignicola*. Toutefois, la liquéfaction est lente.

Les recherches sur les Champignons pectinolytiques, en général phytopathogènes, se poursuivent également mais les auteurs s'efforcent plus de trouver le mécanisme enzymatique des différentes enzymes sécrétées, que d'allonger la liste des Champignons pectinolytiques.

Phaff (1947) (116) étudie *Penicillium chrysogenum*. Ce champignon forme deux sortes d'enzymes : une polygalacturonase et une pectine-estérase. Toutes deux sont adaptatives car elles ne se forment qu'en présence de pectine, d'acide pectique, d'acide *d*(+)-galacturonique, d'acide mucique et d'acide L-galactonique. Ces enzymes sont exocellulaires (exoenzymes), le mycélium lui-même n'en fournit qu'à l'état de traces. La production des enzymes se fait mieux avec de l'azote minéral (sel d'ammonium) qu'avec de l'azote organique (acides aminés).

Bissochlamys fulva a été analysé par deux groupes d'auteurs ; les premiers : Beaven et Brown (1949) (6) trouvent une protopectinase qui désagrège les tissus végétaux, ainsi qu'une pectine-estérase. Deux ans plus tard, Reid (136) reprend le même microorganisme et, dans un travail plus approfondi, isole deux enzymes : une polygalacturonase et une pectine-estérase. La première enzyme produit une perte de viscosité de la pectine de 50 %, ce qui correspond à une hydrolyse de 1 % des ponts glucosidiques de la molécule de pectine. Cette enzyme purifiée macère également les tissus végétaux : Reid conclut que protopectinase et polygalacturonase sont identiques.

Jermyn et Tomkins (61) examinent l'action des enzymes de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expensum* et *Aspergillus aureus* par chromatographie. Ces champignons sont cultivés sur un milieu à base de pectine comme seule source de carbone. Le liquide de culture est ensuite traité par le sulfate d'ammonium pour l'extraction des enzymes. Il ressort que ces champignons produisent une polygalacturonase que les auteurs nomment PGI. Elle agit aussi bien sur les pectines déméthylées que sur les pectines méthylées (il s'agit donc de deux enzymes comme nous le verrons plus tard). La chromatographie des solutions de pectines soumises aux préparations enzymatiques indique la présence d'acide mono-, di-, tri-, tétra- et pentagalacturonique. C'est donc la preuve que les enzymes attaquent la molécule de pectine au hasard de la chaîne. Au début du contact enzyme-pectine, 30 % des ponts sont rompus très vite, puis l'hydrolyse continue très lentement et l'acide galacturonique n'apparaît que tardivement.

Alors que tous ces auteurs analysent l'action enzymatique des Champignons d'une manière approfondie, d'autres se contentent d'éprouver l'action de Champignons sur les tissus végétaux. Ainsi pouvons-nous adjoindre l'étiquette de pectinolytique aux Champignons qui suivent :

quelques espèces des genres *Cephalosporum*, *Hormodendrum*, *Phoma*, *Alternaria*, *Trichothecium* (Fuller, 1946) (46). D'après Stuart et Emsweller (160), *Chaetomium globosum*, une espèce de *Metarrhizium* et *A. niger* digèrent les parois cellulaires et les espaces intercellulaires.

Matus, en 1948 (96), tente de résumer l'action des enzymes pectinolytiques connu, il emploie encore la nomenclature ancienne (pectinase).

La période de 1940 à 1950 ne possède qu'un seul travail sur la fonction pectinolytique du sol, mais c'est un rapport d'une importance capitale pour tous les travaux futurs. Wieringa (179) met au point un milieu pour la numération et l'isolement des pectinolytiques aérobies du sol. Ce milieu, pour boîtes de Petri, est constitué de deux couches : la première est faite de gélose additionnée de chlorure de calcium et de sels minéraux, la deuxième dans laquelle onensemence les dilutions de terre, comprend une solution de pectine très déméthylée (type ruban rouge) qui est versée sur la couche de gélose solide. Les cations de calcium diffusent dans la pectine qui prend en gel. Les colonies de microorganismes qui se développent sont de deux types : les pectinolytiques qui creusent des godets dans la couche de pectine et les non pectinolytiques sans action sur celle-ci. Wieringa isole, grâce à cette technique, de nombreux Actinomycètes, Champignons, Levures et Bactéries pectinolytiques.

Les autres publications nous amènent à la période de 1950 à 1960 où les travaux sur la pectinolyse pullulent. Cette décade groupe, à elle seule, plus de recherches que toutes celles entreprises jusqu'ici. Cependant, l'étude de la fonction pectinolytique dans le sol reste toujours le parent pauvre. Wieringa avec Smit (181) analysent d'abord les feuilles mortes fraîchement tombées et celles encore sur l'arbre. Sur ces feuilles (chênes, hêtres), ils découvrent un Champignon pectinolytique : *Pullularia pullulans* à l'exclusion de tout autre microorganisme. C'est donc ce germe qui attaque le premier la pectine des feuilles fraîchement tombées. Une expérience *in vitro* confirme d'ailleurs ce fait : sur des feuilles de chênes conservées dans un bocal sous atmosphère humide, Wieringa compte au début de l'expérience 15 000 *P. pullulans* par gramme de feuille ; après 24 heures, il y en a 270 000 et 1,3 million au bout de 4 jours. A cette augmentation correspond une diminution de la pectine des feuilles : d'abord de 5 %, puis de 25 %. Après un certain temps, lorsque la litière vieillit, *P. pullulans* disparaît laissant la place à d'autres Champignons (très variés) et les Bactéries pectinolytiques apparaissent elles aussi. Mais cette microflore pectinolytique secondaire varie avec le type de litière. Dans une litière de feuilles de chênes et de sapins, Wieringa ne trouve que des Champignons (espèces non précisées) alors que dans une litière de feuilles de hêtre l'auteur isole, à côté de nom-

breux Champignons, beaucoup de Bactéries pectinolytiques (pas de noms d'espèces). Wieringa passe ensuite à l'étude du sol (180) : dans le jardin expérimental de Wageningen, il traite des lots de 42 m² de terre avec 60, 30, 15, 10, 5 et 0 kg de chaux, le pH de ces lots étant respectivement de 7,6, 7, 5,3, 5,3, 4,6, 4,5. Le nombre des Bactéries pectinolytiques trouvées est de 7, 8, 7, 5, 4 et 4 fois 100 000 par gramme de sol. Ce nombre dépend donc avant tout du pH du sol. Toutefois, les *Streptomyces* sont les microorganismes pectinolytiques dominants dans les échantillons à pH voisins de la neutralité : ils constituent 80-90 % du total des pectinolytiques dans les lots avec 60 et 30 kg de chaux. A pH 5,3, la proportion de ces germes est de 50-70 %. Mais avec un pH de 4,5, il n'y en a plus que 15 % ; ce sont alors les Champignons qui dominent.

Wieringa donne quelques précisions sur le type de Bactéries rencontrées : la plupart du temps, il s'agit de *Bacillus* (pas de nom d'espèces). Quelquefois, l'auteur isole des *Pseudomonas fluorescens* (d'après l'auteur, *P. fluorescens*). Les Levures sont présentes dans tous les échantillons. Wieringa étudie également le rouissage du lin au sol. *Cladosporium herbarum*, *P. pullulans*, *Cryptococcus albidus* (levure), une espèce de *Rhodotorula* et *P. fluorescens* sont les microorganismes pectinolytiques les plus souvent isolés. Ces résultats confirment en partie les travaux de Haumann, 1902.

Kerr (74), la même année, met au point une technique pour isoler les Bactéries pectinolytiques phytopathogènes du sol. Elle repose sur le fait que ces germes peuvent s'introduire par les lenticelles des tubercules de pomme de terre et y provoquer une pourriture molle, tandis que les pectinolytiques banaux pénètrent seulement par une blessure du tubercule. A l'aide de cette technique, l'auteur examine différents sols et isole régulièrement des phytopathogènes aérobies. Malheureusement, aucun nom d'espèce n'est mentionné.

En 1956, Lambina (82) effectue également un travail sur l'activité pectinolytique du sol. Utilisant un tout autre procédé que celui de Wieringa, elle devait aussi arriver à des conclusions très différentes. Les dilutions de terres sont ensemencées sur du bouillon de pommes de terre. Le liquide de culture est testé sur des tranches de pommes de terre. Si celles-ci sont ramollies, il y a présence de pectinolytiques dans le tube correspondant. Dans les sols de prairies mixtes, *Clostridium polymyxa* est le microorganisme dominant, viennent ensuite : *Bacillus mesentericus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus mycoides*, *Ps. brunneum* et *Ps. fluorescens*. Pendant la troisième année de culture de la prairie, on trouve le maximum de pectinolytiques dans la rhizosphère. D'après l'auteur, la détermination du nombre de *Cl. polymyxa* doit, dans la plupart des cas, indiquer l'intensité de la pectinolyse. Lambina

ne parle absolument pas des Champignons, ni des Actinomycètes, ce n'est pas étonnant, car sur un milieu liquide en tube la croissance des Bactéries est très rapide, inhibant ainsi la culture des autres microorganismes.

En 1956, Jones (64) étudie un certain nombre de prélèvements d'eaux, au point de vue pectinolyse aérobie. Deux méthodes ont été employées : l'une, en tubes, l'autre sur plaques avec un milieu du type Wieringa. L'auteur ne donne aucun nom d'espèce mais rapporte les chiffres suivants (tableau III) :

TABLEAU III

Nombre d'échantillons	Nombre de pectinolytiques par 100 cm ³ d'eau (technique en boîtes)	Rapport au nombre total des germes
6	Eau de puits : 867	1 : 133
8	Eau de source : 238	1 : 176
6	Eau de fleuve : 267	1 : 222
9	Eau de rivière : 733	1 : 227
8	Eau de pluie : 1 162	1 : 932
6	Eau de fossé : 2 283	1 : 3 247
43	Moyenne : 891	1 : 1 472

Les rapports des pectinolytiques avec la microflore totale se tiennent dans la moyenne de ceux trouvés pour les sols ; cependant, fait curieux, il semble que les pectinolytiques soient relativement plus nombreux dans les eaux claires que dans les eaux polluées.

En 1959, Dorey (31) analyse 31 sols de l'Angleterre par la technique des plaques de Wieringa et par percolation sur une solution de pectine : beaucoup d'Actinomycètes pectinolytiques apparaissent sur les plaques, mais Dorey n'isole aucun *Cl. polymyxa* ni *E. carotovora*. L'auteur par contre découvre un élément nouveau appartenant au genre *Flavobacterium* (25 souches isolées) ; la description de ce nouveau germe pectinolytique est très complète. C'est un bâtonnet immobile, mince, long, produisant des colonies jaune-orangé, Gram-négatif. Par ses caractères, il ne peut s'identifier avec aucun des *Flavobacterium* connus. Dorey en fait un germe nouveau qu'il nomme : *Flavobacterium pectinovorum*. L'activité enzymatique est optima à pH 7,5, à 37° C et agit plus fortement sur l'acide pectique que sur la pectine. L'enzyme rompt les ponts glucosidiques au hasard de la chaîne-molécule ; elle est adaptative. Nous verrons plus loin, que la nomenclature de ce germe

n'est pas conforme à celle de la systématique française. Ce bâtonnet, étant immobile, rentre dans le genre *Empedobacter*, il s'appellera donc *Empedobacter pectinovorum* nv. comb.

Meyer (99) étudie l'activité microbienne de trois types de sol : Mull, boue d'étang et Mor. Entre autres composés, il inclut de la pectine à ces différentes terres et mesure la consommation d'oxygène : il y a toujours augmentation de la respiration après inclusion de la pectine. Mais les taux d'oxygène consommé sont très différents suivant la nature du sol et l'horizon où il a été prélevé. Ainsi, le Mor et les boues sont activées de 200 à 300 % par rapport à la terre témoin, et le Mull l'est de 250 à 700 %. Pour ce dernier cas, il ressort nettement que la digestion de la pectine incluse dans l'échantillon est d'autant plus grande que le contenu en matière organique et le C/N sont bas. Ceci, évidemment, dans une certaine limite. Il faut donc distinguer l'activité pectinolytique du sol mesurée sans addition de pectine et l'activité pectinolytique en présence du sol qui peut être toute différente. Toutefois, cette activité potentielle est plus ou moins hypothétique car aucun sol ne reçoit dans la nature des rations de pectine pure !

Nous quittons la microbiologie du sol proprement dite avec l'article de G. Jacobelli (60). L'auteur prépare un milieu à base de pectine déméthylée (voir matériel et technique) et ensemence, sur ces gels des microorganismes de toutes sortes : sont liquéfiantes : *B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Bacterium radicum*, *Ps. fluorescens*, *Torula rubra* (levure), *Saccharomyces ellipsoïdes*, *Penicillium glaucum*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia minor*.

Ne liquéfient pas la pectine : *Bacillus cereus*, var. *mycoides*, *Azotobacter chroococcum*, *Cytophaga* sp. Les différents auteurs décrivent *Ps. fluorescens* tantôt comme pectinolytique, tantôt comme non pectinolytique. Ce qui est certainement dû à une mauvaise détermination des souches.

Fernando et Stevenson (43) notent que *B. subtilis* et *B. megatherium* sécrètent des enzymes pectinolytiques et attaquent des tubercules de pomme de terre lorsque ces derniers sont imprégnés d'eau. *B. carotovorum* (*E. carotovora*) et *B. cinerea*, au contraire, attaquent les disques de pomme de terre d'emblée.

Betrabet et Bhat (12) font une étude du rouissage *in vitro* de *Malanchra capitata* et d'*Hibiscus cannabinus*. Ils isolent surtout des *Pseudomonas* qui liquéfient rapidement la pectine. Les autres aérobies souvent trouvés sont : *A. aerogenes*, *A. cloacæ*, *E. freundii*, *A. brookeri*, *Fl. aquatile*, *Bacillus* sp. ; 6 souches seulement d'anaérobies appartenant à *Clostridium pectinovorum* (*Plectridium pectinovorum*) ont été isolées. Ainsi certaines Entérobactériacées semblent actives dans le rouissage. Peut-être ne s'agit-il aussi que de germes d'accompagnement sans

action sur la pectine (seuls 2 *Pseudomonas* sont réellement étudiés au point de vue pectinolyse).

Les *Pseudomonas* ont fait l'objet d'un très intéressant travail de Paton (113). L'auteur est surpris de voir que l'on néglige les propriétés pectinolytiques de certains *Pseudomonas* qui sont pourtant connus depuis longtemps. Certaines nécroses de la tomate attribuées à *E. carotovora* ne peuvent être déterminées avec précision et l'on classe le germe le plus souvent comme *coli-forme*. Or, ce sont pour la plupart des *Pseudomonas* pectinolytiques à pigment vert. A la suite de cette observation, l'auteur a isolé plus de 400 souches de *Pseudomonas* pectinolytiques à partir du sol, de l'eau et de plantes malades. Actuellement, ces souches sont soumises à une étude systématique approfondie (travail non encore paru).

Pour Dowson (34) le problème est un peu différent. Parmi les Bactéries phytopathogènes, l'auteur pense que, seules, quelques *Erwinia* sont pectinolytiques. Les *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Corynebacterium*, d'après lui, ne le sont pas. C'est certainement vrai en ce qui concerne les *Corynebacterium* ; pour le groupe des *Pseudomonas* et des *Xanthomonas* trop de preuves sont en faveur de la pectinolyse positive, au moins pour certaines espèces au sein de ces groupes. Dowson pense qu'il faut diviser le groupe des *Erwinia* en deux : l'un, les *Erwinia* proprement dites, non pectinolytiques (ainsi que les *Agrobacterium*), l'autre, les *Pectobacterium* comprenant l'espèce unique : *Pectobacterium carotovorum* (*E. carotovora*) avec ses variétés *aroidæ*, *atrosepticum*. Dowson ne distingue pas *E. carotovora* d'*E. aroidæ*, *E. phytophthora*, *E. chrysanthemi*, *E. rhaponticum* ne sont que des variétés de *carotovora*, se distinguant seulement par la plante-hôte plus spécifique. *A. aerogenes* n'est pas pectinolytique.

Ali (1) étudie le rouissage du jute (*Corchorus capsularis*) plante textile réputée comme très difficile à rouir. Parmi les Bactéries étudiées (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. sphæricus*, *B. lentus*, *B. pumilus* et *B. polymyxa*), *Cl. polymyxa* est seul capable de rouir le jute en 9 jours, les fibres sont bien séparées.

Potter et McCoy (123) ont entrepris une étude nutritionnelle sur *Cl. polymyxa*. Ils montrent que la meilleure source d'azote pour la production des enzymes de la pectinolyse est l'extrait de levure. La pectine est d'autant plus dégradée que le pH est réajusté en cours de fermentation. Si l'on tient compte de ces conditions optima, *Cl. polymyxa* fermente 70-80 % d'acide pectique en 12 heures, mais seulement 50 % de pectine en 120 heures. L'acide galacturonique produit est aussi fermenté.

Ce *Clostridium* anaérobie facultatif nous conduit aux travaux sur les pectinolytiques anaérobies stricts qui sont nombreux. L'École française

continue et approfondit ses recherches, le travail de base restant toujours celui de M. Raynaud sur les bactéries anaérobies pectinolytiques. Ce même auteur avec Saissac et Brugières reprend le même problème en 1952 (143). Raynaud avait déjà remarqué en 1949 que les anaérobies étudiés pouvaient se diviser en deux groupes : le premier comprenant des germes à activité pectinolytique forte et stable (*Cl. aurantibutyricum*, *Cl. butyricum* C8, *Cl. acetobutylicum* By, *Pl. pectinovorum* PC, *Pl. virens* et *Cl. saccharobutyricum* 860), l'autre groupe, bien que rouisseur, n'attaquant pas ou peu la pectine (*Cl. roseum*, *felsineum*, *corallinum*, *saturni-rubrum*, *Pl. pectinovorum* PJ et 3723). Comme explication de ce phénomène, M. Raynaud et collaborateurs avancent l'hypothèse que l'activité pectinolytique n'est pas un caractère stable de ces espèces. Par ailleurs, l'activité pectinolytique n'est pas liée pour eux à un groupe homogène, mais peut fort bien se trouver chez des butyriques ordinaires du type *Cl. butyricum*. Nous verrons que cette position a évolué d'une façon radicalement opposée.

A.-R. Prévot (129) résume la même année la question des espèces pectinolytiques stables et instables de façon précise : le premier groupe attaque la pectine, le galacturonate, et rouit bien la plupart des plantes textiles ; le deuxième groupe ne digère ni la pectine, ni le galacturonate, mais comprend des rouisseurs moyens. Deux hypothèses sont avancées pour l'explication de ces faits :

- 1) Les quatre espèces rouisseuses mais non pectinolytiques pourraient digérer la pectine native des plantes ;
- 2) Ces espèces ne seraient que des auxiliaires puissants du rouissage.

Le problème est encore irrésolu actuellement.

Cependant, il restait une question beaucoup plus importante à résoudre ; celle de la position systématique de la souche C8 de *Clostridium butyricum*. A.-R. Prévot et M. Raynaud (132) ont pensé à juste titre que les enzymes de la pectinolyse étaient des enzymes majeures ; la souche C8 ne pouvait donc rester dans l'espèce *Cl. butyricum* non pectinolytique, mais devait être individualisée en espèce nouvelle : *Cl. pectinolyticum*, *Clostridium* pectinolytique, non pigmenté, coagulant le lait et ne digérant pas la gélatine. Ainsi était posée la question de la systématique de tous les anaérobies pectinolytiques. Ces auteurs en ont fait un sous-genre du genre *Clostridium* : *Clostridium aurantibutyricum*, pectinolytique le plus stable et le plus énergétique. Ce sous-genre, qui est actuellement devenu la conception classique et logique, évite ainsi le classement de germes pectinolytiques parmi le genre *Cl. butyricum*, défini comme non pectinolytique. Le sous-genre *Clostridium aurantibutyricum* est divisé en pectinolytiques stables et instables (*felsineum*, *roseum*, *haumannii*, *maymonei*, *corallinum*, *saturnirubrum*).

Le groupe des pectinolytiques stables a pris beaucoup d'importance ces dernières années. Il faut citer l'espèce nouvelle *Cl. omnivorum*, décrite par A.-R. Prévot, H. Thouvenot et nous-même (133). Cette espèce est incolore, digère le lait rapidement, liquéfie la gélatine et n'attaque pas le blanc d'œuf. Elle produit de grandes quantités d'amines volatiles (odeurs nauséabondes) et semble particulièrement bien adaptée aux intestins de poissons herbivores dont elle digère la pectine ingérée par l'hôte.

Du côté de l'École australienne, quelques espèces nouvelles ont été trouvées également. *Cl. laniganii* isolé et décrit par Lanigan (84) est un pectinolytique stable et incolore ; la non-digestion du lait et l'absence d'amines comme produit terminal de fermentation le distinguent d'*Omnivorum*. *Clostridium flavum*, étudié par McCoy et McClung (93) est stable aussi, mais produit un pigment jaune canari. Il diffère de *felsineum* et de *haumannii* par son pigment qui ne vire jamais au noir, ses longues spores cylindriques et sa fermentation butyrique typique avec peu de produits volatils neutres. Les auteurs japonais Nakahama et Harada (10) ont isolé *Clostridium kaneboi* d'un sol à canne à sucre. Contrairement à *flavum*, sa fermentation donne surtout des solvants neutres : butanol, éthanol, acétone. Son pigment n'est pas clairement défini : étant d'un jaune très pâle, on peut se demander s'il y a réellement sécrétion d'un pigment ou non. Enfin, dernière nouveauté dans le domaine des anaérobies, l'isolement d'un *Clostridium* à la fois pectinolytique et cellulolytique. L'auteur Gurfel (51) n'a toutefois pas encore donné de nom à cette espèce.

Tous les anaérobies stricts pectinolytiques, cités jusqu'à présent, étaient des sporulés. Mais il semble que certains asporulés anaérobies soient également capables de pectinolyse. Ainsi, Bryant et Small (130) ont isolé deux germes pectinolytiques du rumen des bovidés : l'un *Lachnospira multiparus* appartient aux *Bacteriaceæ* ; l'autre *Succinovibrio dextrinosolvans* se classe parmi les *Vibrionaceæ*. Nous remarquerons qu'il s'agit à la fois de deux genres nouveaux, créés tout spécialement pour ranger ces espèces.

La dernière décade a surtout été une époque de recherche approfondie sur les enzymes de la pectinolyse. Du côté des anaérobies, nous savons hélas très peu de choses. Seule, l'École japonaise a travaillé la question en étudiant *Cl. felsineum* (70) (71) (72). Ce germe abaisse fortement la viscosité d'un gel de pectine tout en augmentant le pouvoir réducteur. Les produits de dégradation de la pectine sont des polyuronides, rarement de l'acide $\alpha(+)$ -galacturonique. Le pH optimum d'action est de 5,0 à 5,6 à une température de 45° C. L'enzyme est inactivée à 70° C. Le nickel et le sodium stimulent la réaction, tandis que l'acide tannique, l'oxalate d'ammonium, le nitrate d'argent, l'acé-

tate de plomb et l'acide arsénique sont des inhibiteurs. En purifiant l'enzyme, Kaji s'est aperçu qu'en réalité il y en avait deux : une endopolygalacturonase en très grande quantité qui libère des polyuronides et agit au hasard de la molécule de pectine, l'autre, une exo-polygalacturonase, en petite quantité, attaquant les polyuronides libérés par la première en bout de chaîne. Quant aux Bactéries aérobies, de nombreux travaux sur les enzymes pectinolytiques ont été effectués mais la plupart des auteurs n'ont pratiquement travaillé que sur un seul groupe de germes : *Erwinia carotovora-aroideæ*, aussi sommes-nous très renseignés sur les enzymes de ces Bactéries et beaucoup moins sur les autres pectinolytiques. Ces deux germes semblent produire des enzymes différentes. En effet, tous les auteurs, Echandi (36), Tribe (167) et Wood (185), trouvent pour *E. aroideæ* un pH optimum d'action de 8 à 9, alors que pour *E. carotovora* il est de 6 environ.

Pour Echandi (36), Kraght, Mortimer (80), *E. carotovora* et *E. aroideæ* agissent en attaquant acide pectique et pectine au hasard de la molécule. Il s'agit donc d'endopolygalacturonase (le terme de dépolymérase peu précis est parfois employé). Les auteurs ne sont pas d'accord sur la production de pectine-méthylestérase. Echandi et Wood nient la présence d'une telle enzyme chez *E. carotovora*, *aroideæ* et *atroseptica* ; au contraire, Kraght découvre une PME chez *E. carotovora*. La fugacité de cette enzyme disparaissant rapidement du liquide de culture peut en être la cause.

Lapwood (85) compare l'action de *B. aroideæ* à divers *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, parmi lesquels *Ps. syringæ*. Tous les germes étudiés sécrètent des enzymes pectinolytiques dont le pH optimum est de 8,5 à 9. Mais *B. aroideæ* en produit beaucoup plus et plus rapidement que les non-phytopathogènes (action mesurée sur disques de pommes de terre), ce qui lui permet d'attaquer et de pourrir les bulbes. Les Bactéries pectinolytiques mais non phytopathogènes libèrent des enzymes plus tardivement, la plante peut ainsi s'opposer à temps à l'attaque de ces germes.

Se basant sur le système des enzymes pectinolytiques, de Schubert, que nous étudierons plus loin, Smith (151) effectue un travail remarquable sur l'activité pectinolytique de nombreuses souches bactériennes. Toutes les bactéries testées n'agissent qu'à pH 7,5, très peu à pH 5,5 et 3,5. Il s'agit, selon l'auteur, de la γ -glucosidase de Schubert : attaque de l'acide pectique et de la pectine à pH 7,5, enzyme activée par le calcium (nous verrons plus loin qu'il s'agit en réalité de deux enzymes distinctes). Seules les Bactéries phytopathogènes sécrètent une pectine-méthylestérase (optimum d'action à pH 7,5), ce sont : *E. aroideæ*, *E. atroseptica*, *E. carotovora*, *E. phytophthora*, *Xanthomonas campestris* et *vascularum*. Suivent les Bactéries pectinolytiques ne produisant pas

de PME : *E. carotovora* (1 souche sur 5), *E. rhapontici*, *Ps. marginalis*, *Ps. medicaginis*, *Ps. syringæ*, *X. papavericola*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. subtilis* des *Flavobacterium* et des *Pseudomonas* du sol, enfin quelques souches d'*Enterobacteriaceæ*, *K. aerogenes*, *K. cloacæ*, *E. freundii*. Énumérons maintenant les bactéries non pectinolytiques : *Agrobacterium radiobacter*, *A. rhizogenes*, *A. tumefaciens*, *Corynebacterium faciens*, *C. flaccumfaciens*, *C. michiganense*, *E. tracheiphila*, *Ps. coronofaciens*, *Ps. delphinii*, *Ps. marginalis* (2 souches sur 3), *Ps. medicaginis* (1/3), *Ps. mors prunorum*, *Ps. prunicola*, *Ps. syringæ* (4/5), *Ps. tabaci*, *X. begoniæ*, *X. hyacinthis*, *X. juglandis*, *X. malvacearum*, *X. phaseoli*, *X. pruni*, *X. vascularum* (3/4), *Serratia marcescens*, *Flavobacterium aquatile*, *Fl. devorans*, *Kl. pneumoniæ*, *Rhizobium* sp., *Ps. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* et *E. freundii* (10 sur 11).

Si les Bactéries ont un pH optimum d'action aux environs de 7, il en va tout différemment des Champignons, microorganismes également très étudiés, quant à l'activité de leur enzyme pectinolytique. Le travail de Tribe (167) sur *B. aroideæ* et *Botrytis cinerea* est déjà fort significatif. Les deux organismes macèrent et tuent les cellules végétales, mais l'activité optima de *B. cinerea* est de 4 alors que celle de *B. aroideæ* est à pH 8. Nous passerons tout d'abord en revue les Levures : parmi les innombrables espèces, peu sont pectinolytiques. Etchelles et Bell (41) ont étudié 143 souches de levures représentant 66 espèces et 15 genres. Seules 4 souches appartenant aux espèces *S. fragilis* et *S. cerevisiæ* se sont avérées pectinolytiques.

Luh et Phaff (88) arrivent à la même conclusion : sur 181 souches groupant tous les genres connus, 6 souches seulement appartenant à *S. fragilis* et à sa forme imparfaite *Candida pseudotropicalis*, liquéfient la pectine. L'enzyme est exocellulaire ; elle agit au maximum à un pH de 3-4 et à 55° C. La viscosité de la pectine est diminuée fortement, mais on ne peut déceler une baisse du taux de pectine par les techniques usuelles de dosages. Des acides di- et trigalacturoniques sont cependant isolés. Cette levure ne sécrète pas de pectine-estérase. Luh et Phaff approfondissent leurs travaux sur cette question (89) (90). L'enzyme est nommée Yeast-Polygalacturonase ou YPG. Elle attaque l'acide pectique de préférence à la pectine. L'hydrolyse maximum de l'acide pectique avec l'enzyme très purifiée est de 48 %, le pH optimum de 4,4 ; l'acide nitrique, seul inhibe son action. L'enzyme dans un premier temps hydrolyse 25 % des ponts glucosidiques sans libération d'acide galacturonique. Dans un second temps, 48 % des ponts sont rompus et alors apparaît l'acide monogalacturonique. On pourrait donc croire à deux enzymes distinctes, mais les auteurs démontrent qu'il s'agit d'une seule

et même enzyme (par électrophorèse) ; le schéma d'action suivant a pu être établi :

acide pectique	→	acides tétra- + tri- + digalacturonique (rapide 25 %)
lent	{	acide tétragalacturonique → acides tri- et monog.
23 %		acide trigalacturonique → acides di- et monog.

Ces travaux ont été confirmés par d'autres chercheurs en particulier Roelofsen (137) et Furnichi (47).

L'enzyme attaquant la molécule d'acide pectique au hasard et à pH acide se retrouve dans maints autres Champignons. Takehama et Ogura (163) la découvrent chez : *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. oxalicum*, *Rh. tritici*, *Rh. javanicus*, *Asp. oryzae*, *Asp. usami* ; *P. expansum* possède également une pectine-estérase.

Etchelles et collaborateurs (42) montrent combien l'activité pectinolytique est répandue parmi les Champignons surtout inférieurs ; 1 000 souches isolées sur des fleurs de concombres, groupant 72 espèces et 34 genres, ont été étudiées ; voici les Champignons pectinolytiques (beaucoup sont, en même temps, cellulolytiques) :

Fusarium roseum,
 » *oxysporum*,
 » *solani*,
 » *moniliforme*,
 » *episphæria*.

Penicillium oxalicum, *janthinellum*, *skekii*, *expansum*, *atromentosum*, *chermesinum*, *duclauxi*, *funiculosum*, *gladioli*, *herquei*, *implicatum*, *piscarium*, *restrictum*, *rugulosum*, *thomii*, *urticae*, *variabile*, *sublateritium*, *frequentans*.

Ascochyta cucumis.

Cladosporium cladosporioides (28 souches).

Alternaria tenuis (34 souches).

Aspergillus elegans, *fumigatus*, *niger*, *sydowi*, *terreus*, *unguis*, *versicolor*.

Cephalosporium sp.

Colletotrichum lagenarium.

Curvularia trifolii.

Helminthosporium sp.

Humicola fuscoatra.

Mucor silvaticus.

Myrothecium roridum.

Pestalotiopsis macrotricha.

Phoma sp.

Pullularia pullulans.

Rhizopus arrhizus, *nigricans* (= *stolonifer*).

Sporotrichum pruinosum.

Stagonospora sp.

Thielavia basicola.

Trichoderma viride.

Truncatella sp.

En étudiant la microflore du bois, H. Lyr (91) isole également un certain nombre de Champignons pectinolytiques : *Schizophyllum commune*, *Collybia velutipes*, *Trametes versicolor*, *Phellinus igniarius*, *Fomes marginatus*, *Coniophora cerebella*, *Merulius lacrymans*, *Glocophyllum sæpiarium*, *Trichoderma viride*, *Chætomium globosum*. Les 8 premiers sont des Basidiomycètes. Avec la pectine comme seule source de carbone, toutes les souches produisent une « pectinase » (polygalacturonidase). Les producteurs de pourriture brune sont, de loin, les plus actifs. La production d'exoenzymes n'est pas en rapport avec la quantité de mycélium formé mais plutôt inversement proportionnelle. La dynamique de la production enzymatique est spécifique à l'enzyme et non à l'espèce. Le mécanisme de synthèse de l'enzyme doit être identique d'une espèce à l'autre. H. Saito (144) étudie en détail les enzymes de la pectinolyse d'*A. niger* et décèle deux polygalacturonidases : l'une, constitutive, attaque la molécule au hasard, libérant les acides tri- di- et monogalacturonique (opt. d'action à pH 4), elle dégrade de préférence les acides pectiques. L'autre est adaptative et lyse la molécule en bout de chaîne, libérant seulement de l'acide monogalacturonique.

Les mêmes conclusions ressortent du travail de Brooks et Reid (18) sur *Aspergillus foetidus*. Lorsqu'il croît en profondeur, ce champignon donne une enzyme D qui libère des polyuronides à partir de l'acide pectique, cultivé en surface, l'enzyme qu'il produit attaque la molécule d'acide pectique en bout de chaîne avec formation d'acide monogalacturonique seulement.

Même processus pour *Fusarium moniliforme* étudié par Singh et Wood (149). Les pectates sont scindés en fragments larges de polyuronides tandis que les pectines sont dépolymérisées en fragments d'acides monogalacturonique. Ces enzymes sont adaptatives ; le jus de pomme inhibe la formation d'enzymes. *Fusarium oxysporum* (Waggoner) (174) possède une pectine-estérase constitutive qui est inhabituelle chez les Champignons car elle agit à pH 7. En présence de pectine, ce champignon produit aussi une polygalacturonidase (β , α -glucosidase de Schubert) avec un optimum d'action à pH 4,6 et une préférence pour les acides pectiques. Pour Winstead et Walker (183) la pectine-estérase,

sécritée par de nombreux Champignons phytopathogènes, serait la cause du brunissement des vaisseaux de végétaux attaqués (*B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. solani*).

Echandi et Walker (37) ont travaillé sur *Sclerotinia sclerotiorum* qui sécrète principalement deux enzymes : une pectine-estérase et une polygalacturonase. Le pH optimum de cette dernière est de 4 ; elle agit surtout sur les pectates et libère essentiellement de l'acide monogalacturonique.

Les auteurs japonais Takehama et Ogura (163) isolent trois enzymes à partir du jus de culture de *Sclerotinia libertiana* : une pectine-estérase, active surtout à pH 4,5 et à 50° C, détruite à 70° C, une polygalacturonase agissant en bout de chaîne sur les acides pectiques (optimum d'action à pH 4,5), enfin, une polygalacturonase qui attaque la molécule de pectine au hasard. Cette dernière enzyme est détruite à 40° C déjà ; optimum d'activité à pH 4,7.

Verticillium albo-atrum (Scheffer) (148) et *Verticillium dahliae* (Kamal) (73) produisent une pectine-estérase et une polygalacturonase scindant les pectates au hasard de la molécule. C'est grâce aux deux enzymes que ces Champignons pénètrent et attaquent la plante dans laquelle la pectine est digérée.

Certains auteurs sont toujours certains de l'existence d'une enzyme protopectinasiqne distincte des autres enzymes pectinolytiques. L'expérience de Wood et Gupta (186) serait en faveur de cette conception : *Pythium debaryanum* sécrète une pectine-estérase et une polygalacturonase, celle-ci, active surtout sur les pectates, n'agit pas à pH 8 alors que les disques de carottes sont digérés par le liquide de culture à ce pH.

Cladosporium cucumerinum a été étudié par Husain et Rich (59). La polygalacturonase sécrétée est constitutive et lyse de préférence les pectates à pH 6 ; des polyuronides sont libérés. Ce champignon sécrète également une cellulase. *Rhizopus stolonifer* donne une pectine-estérase ainsi qu'une polygalacturonase qui agit à pH 4,5 (Srivastava) (157).

Roboz et collaborateurs (138) décrivent une enzyme produite par *N. crassa* qu'ils nomment dépolymérase. Cette enzyme agit surtout à pH 6, sur pectate et sur pectine, libérant des polyuronides. Elle peut donc être assimilée aux polygalacturonidases.

Rhizopus tritici (Ozawa) (111) attaque les substances pectiques de deux façons : par une polygalacturonase I, séparant des polyuronides, et par une polygalacturonase II qui rompt les ponts glucosidiques en bout de chaîne avec production d'acide galacturonique seulement.

Enfin pour *Ceratostomella ulmi* Berkman (11) trouve une seule enzyme (dépolymérase) qui scinde au hasard les molécules d'acide pectique. C'est, nous le croyons, un synonyme de polygalacturonidase.

Les travaux sur les enzymes de la pectinolyse prouvent que ces enzy-

mes sont nombreuses et variables suivant les groupes de microorganismes. Les Champignons agissent à pH plus acide, les Bactéries ont un pH d'action voisin de la neutralité. A côté de la grande subdivision : pectine-estérases et polygalacturonidases, il apparaît que ces dernières surtout doivent former un groupe de plusieurs enzymes distinctes. Le problème de classification des enzymes de la pectinolyse a préoccupé maints auteurs ; nous citerons les trois principaux :

Schubert (147) élabore le premier système de ce genre. Il pense tout d'abord que le nom de *glycosidases* est préférable à celui des polygalacturonidases, car ces enzymes s'attaquent à la liaison glucosidique des deux maillons d'acide galacturonique. Il sépare ce groupe en trois enzymes suivant leur pH d'action ; nous résumons, dans le tableau IV, le travail de Schubert.

TABLEAU IV

Nom des enzymes	β -pectine-glycosidase	α -pectine-glycosidase	γ -pectine-glycosidase
pH optimum d'action	3,5	5,5	7,0
Substrat préférentiel	Acide pectique, pectine peu méthylée, uronides.	Pectine fortement méthylée seulement.	Pectine et acide pectique.
Catabolites	Acides mono-, di- et trigalacturonique.	Polyuronides à partir du tétragalacturonique.	Polyuronides.
Effets des cations	Na^+ : abaisse le pH optimum et restreint les limites d'action.	Na^+ : élargit les limites d'action, hausse le pH optimum.	Ca^{++} : indispensable pour l'activité optimum.

Trois ans plus tard, en 1957, Demain et Phaff (28) établissent un nouveau système à la lumière de toutes les découvertes qui ont été faites entre-temps. Ces auteurs reconsidèrent d'abord les trois grands groupes traditionnels d'enzymes : protopectinase, polygalacturonidase, pectine-estérase. Pour eux, il est certain que le premier groupe est purement hypothétique, car il a été démontré que des polygalacturonidases purifiées ou un mélange de celles-ci pourrissaient des tranches de divers végétaux. La protopectinase peut être assimilée aux polygalacturonidases. Les deux autres groupes existent d'une façon certaine.

Les pectine-estérases ou PE peuvent être scindées en deux types d'enzymes :

1) Celui des Champignons, avec un pH optimum d'action de 5-5,5 inactif au-delà de pH 6,5 à 7 ;

2) Celui des Bactéries avec un pH optimum de 7,5 inactif au-dessous de pH 6,0.

Tous deux déméthylent les molécules de pectine, les transformant en acide pectique ou en pectine très peu méthylée. Reste le groupe principal des polygalacturonidases (polygalacturonases) auquel les auteurs ont porté toute leur attention. Ils préconisent d'abord deux divisions :

— La première qui comprend les enzymes attaquant la molécule au hasard et libérant des polyuronides ;

— La seconde dont la base est l'attaque terminale de la molécule avec production d'acide galacturonique seulement.

Ces groupes sont divisés eux-mêmes ; selon le substrat préférentiel de l'enzyme : acide pectique ou pectine. Enfin, en dernier ressort, intervient le pH d'action. Cette conception, nous le voyons, est très différente de celle de Schubert.

Nous résumons, dans le schéma suivant, les données de Demain et Phaff sur les polygalacturonidases qui marquent un grand pas en avant dans ce domaine.

A. — Scission de la molécule au hasard $\rightarrow$ endoenzymes.

1) Pectine attaquée de préférence à l'acide pectique :

Endopolyméthylgalacturonidase ou *Endo PMG*.

a) Hydrolyse partielle de pH 5,0 à 6,0 :

Endopolyméthylgalacturonidase I

(= α -glycosidase de Schubert) ;

b) Hydrolyse partielle de pH 8,0 à 9,0 :

Endopolyméthylgalacturonidase II

(= γ -glycosidase de Schubert) ;

2) Acide pectique attaqué de préférence à la pectine :

Endopolygalacturonidase ou *Endo PG*

(= β -glycosidase de Schubert)

(aucune subdivision de pH).

B. — *Mécanisme terminal de l'hydrolyse = exoenzymes*
(attaque de la molécule en bout de chaîne).

- 1) Pectine attaquée de préférence à l'acide pectique :

Exopolyméthylgalacturonidase ou *Exo PMG* ;

- 2) Acide pectique attaqué de préférence à la pectine :

Exopolygalacturonidase ou *Exo PG*.

La classification de Deuel et Stutz (29) sur les polygalacturonidases ressemble à celle des auteurs précédents, quoique plus simplifiée. Ils subdivisent ces enzymes en trois grands groupes : les PGI, II et III.

La *PGI* attaque au hasard les molécules d'acides pectiques, libérant des polyuronides ; c'est la β -glycosidase de Schubert.

La *PGII* libère des polyuronides de préférence à partir des pectines très méthylées ; c'est l' α -glycosidase ou la γ -glycosidase de Schubert.

La *PGIII* procède en bout de la molécule-chaîne, avec production uniquement d'acide monogalacturonique ; l'enzyme groupe les exoenzymes de Demain et Phaff.

A notre avis, ce système est trop restreint et moins souple que celui de Demain lequel peut être facilement élargi lors de la découverte de nouvelles polygalacturonidases. D'autre part, la terminologie de Demain et Phaff est beaucoup plus précise ; chaque nom indique immédiatement le mode d'action de l'enzyme.

Jusqu'ici, aucune enzyme pectique n'a été obtenue à l'état cristallisé bien que certaines aient été très fortement purifiées.

Que devient l'acide galacturonique libéré au cours de la pectinolyse, par quelle voie est-il assimilé ? C'est le problème que se sont posé quelques chercheurs de 1955 à 1960. Les Bactéries étudiées sont toutes aérobies et, en général, asporulées et à Gram négatif. Ce sont : *E. carotovora*, *E. coli*, *S. marcescens*, *A. aerogenes*, *Ps. syringæ* qui, tous, digèrent l'acide galacturonique mais ne sont pas forcément pectinolytiques en même temps.

Deux sortes de dégradation ont été reconnues : l'une groupant les quatre premières Bactéries mentionnées, l'autre se rattachant à *Ps. syringæ*.

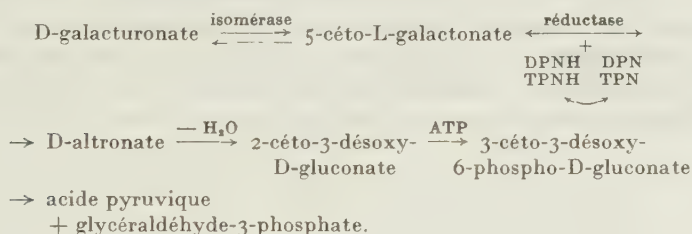
Après de nombreux travaux, W. W. Kilgore et M. P. Starr (77) (78) sont arrivés aux conclusions suivantes (voir également Ashwell (4) et Payne (115)).

Le premier pas dans le catabolisme du D-galacturonate ou du D-glu-

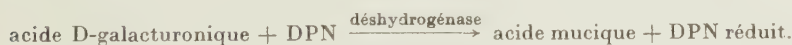
curonate par *E. carotovora* est une isomérisation dans son analogue céturnique. Cette transformation est due à une enzyme nommée *acide uronique-isomérase* qui a été purifiée. L'enzyme peut agir sur n'importe quel acide alduronique pour former l'acide céturnique correspondant; le D-galacturonate, par exemple, est isomérisé en 5-céto-L-galactonate; il n'y a pas de pH net pour un maximum d'activité.

Le second pas est une réduction de l'acide céturnique formé par une enzyme nommée *acide céturnique-réductase*. La réduction a lieu en présence de diphosphopyridine réduit ou de triphosphopyridine-nucléotide. Le pH optimum d'action de l'enzyme est de 7,2 à 7,8. Nous obtenons l'acide altronique à partir de l'acide galactonique. L'altronate est ensuite déshydraté en 2-céto-3-désoxy-d-gluconate. Cet intermédiaire est ensuite phosphorylé avec l'adénosine triphosphate pour former le 2-céto-3-désoxy-6-phosphate qui est scindé en pyruvate et en triose-phosphate. Le cycle de l'acide galacturonique est donc rattaché au cycle glycolytique au niveau du triose.

Le schéma suivant résume ces données :



Ps. syringæ, étudié par les mêmes auteurs, agit tout différemment : l'acide D-galacturonique est transformé en acide mucique par un acide uronique-déshydrogénase : ceci en présence de DPN et non de TPN. L'enzyme a été purifiée par les techniques habituelles, elle n'agit que sur le D-galacturonate ou le D-glucuronate. L'acide mucique est ensuite oxydé à son tour. Ci-dessous, le schéma correspondant :



Payne (114) a isolé, de l'eau de mer, une bactérie Gram-négative, mobile, asporulée, non pigmentée, avec un cil polaire, qui est vraisemblablement voisine des *Pseudomonadaceæ*. Cette bactérie utilise l'acide galacturonique. Payne étudie le métabolisme de cet acide avec des cellules lavées « in resting ». Le galacturonate n'est utilisé qu'en présence d'eau de mer. NaCl et KCl sont indispensables à cette activité. L'induction de l'oxydation dépend de Na^+ , l'oxydation elle-même dépend de K^+ .

L'activité pectinolytique, nous venons de le voir en détail, rentre principalement dans le domaine des microorganismes ; Bactéries, Actinomycètes, Champignons y prennent une part active. La pectinolyse n'est cependant pas exclue des organismes supérieurs ; les enzymes ont été trouvées chez de nombreuses plantes supérieures telles que la tomate, la carotte, l'orange et parmi les animaux : dans l'intestin des escargots. Les Vertébrés, toutefois, ne possèdent pas d'enzymes propres et digèrent la pectine par hôtes interposés (microorganismes).

Les différents chapitres sur l'étude de la fonction pectinolytique ont été très inégalement étudiés : les publications sont abondantes en ce qui concerne le rouissage et les anaérobies pectinolytiques, les Champignons pectinolytiques phytopathogènes et, tout récemment, la classification des enzymes de la pectinolyse. Dans d'autres domaines, en particulier celui de l'activité pectinolytique du sol, la digestion de la pectine ingérée par les animaux, le métabolisme de l'acide galacturonique, les connaissances sont extrêmement réduites. Cette thèse aura donc pour but de résoudre le problème de la fonction pectinolytique du sol, aspect encore méconnu. Pour ce faire, nous avons d'abord mis au point des techniques adéquates qui nous ont permis de préciser le type et l'écologie des microorganismes rencontrés dans les différents sols, d'établir leur fréquence dans ce substrat, puis de pénétrer le mécanisme intime de la pectinolyse pour chacun d'eux.

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

(Pour les techniques spéciales, voir début de chaque partie)

CHAPITRE PREMIER

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'APPRÉCIATION QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES GERMES PECTINOLYTIQUES D'UNE TERRE (et d'autres substrats naturels)

A. — MICROORGANISMES AÉROBIES

1^o Activité polygalacturonidasique ou pectinolytique proprement dite.

Comme nous l'avons vu plus haut, le clivage de la longue chaîne d'acide pectique en tronçons plus petits s'accompagne de deux réactions principales : la perte de viscosité et l'augmentation du pouvoir réducteur. La baisse de viscosité devient très grande pour une attaque minime de la molécule alors que le pouvoir réducteur n'augmente d'une manière appréciable que si celle-ci est fortement attaquée. Nous avons, avec la première propriété, un test extrêmement sensible de l'attaque de la molécule de pectine. Ceci nous conduit à la réalisation de milieux de culture à forte viscosité dans lesquels l'attaque de la pectine par un microorganisme se traduira par une baisse de viscosité mesurable ou même visible (liquéfaction). La réalisation de tels milieux de culture n'est pas chose facile : considérons le schéma de dégradation de la pectine par les agents physicochimiques (p. 9). Nous y voyons que le chauffage aussi bien que les alcalis et les acides dégradent fortement la pectine entraînant irrésistiblement une perte de viscosité du milieu de culture. L'expérience suivante en témoigne : une solution de pectine à 1 % est chauffée à différentes températures et à différents pH.

La viscosité de la solution est ensuite mesurée au viscosimètre. Nous donnons ici les temps d'écoulement en secondes :

Pectine non chauffée acide	535 secondes
Pectine acide chauffée 1 minute à 120° C	80 »
Pectine acide chauffée 5 minutes à 120° C	25 »
Pectine acide chauffée 10 minutes à 100° C	235 »
Pectine acide chauffée 20 minutes à 100° C	135 »
Pectine neutralisée à la soude chauffée 10 minutes à 100° C.....	50 »
Pectine neutralisée à la soude chauffée 20 minutes à 100° C.....	25 »

Il faut donc trouver une température et un temps de chauffage minimum mais suffisants pour avoir une bonne stérilisation, employer une pectine formant des gels très fermes et la moins acide possible de façon à n'ajouter qu'un minimum de soude pour la neutralisation. La Société Française Unipectine dispose de trois sortes de pectine de pomme purifiée (sans sucres) dite pharmaceutique :

— La *pectine ruban brun*, pectine à méthylation maximum (14,5 %), ne formant des gels qu'en présence d'un minimum de 30 % de saccharose et à pH 3 ou 4. Cette pectine est donc impropre pour nos milieux de culture.

— La *pectine ruban rouge*, pectine très déméthylée (6 %), formant des gels avec de faibles concentrations de cations polyvalents, gels encore très fermes à pH 7. De plus, elle n'est pas trop acide (solution à 2 % dans eau distillée pH 4,1).

— Enfin la *pectine ruban violet*, intermédiaire entre la pectine rouge et brun.

Wieringa, en 1947 (179), emploie la pectine ruban rouge et met au point un excellent procédé pour compter sur boîte de Petri les germes

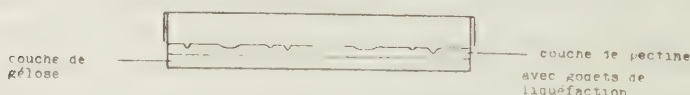


FIG. 7. — Procédé de Wieringa.

pectinolytiques aérobies du sol et d'autres substrats. Sa technique consiste en un milieu à double couche : la première couche est gélosée et contient des ions Ca^{++} sous forme de chlorure de calcium. La seconde, que l'on verse sur la première une fois celle-ci solidifiée, contient le milieu à base de pectine (fig. 7). La couche de pectine prend en gel au

contact du calcium de la première couche. Le gel est suffisamment ferme pour avoir des colonies bien isolées et pour pouvoir retourner la boîte de Petri. Mais, il est difficile d'ensemencer en surface car, au ratissage, la couche de pectine se brise ; il faut donc procéder en ensemençant la dilution de terre dans la solution liquide de pectine. Les colonies pectinolytiques se trouvant dans la profondeur de la couche de pectine y forment une dépression moins nette que les colonies pectinolytiques en surface, assez visible cependant pour être décelée. Le problème de la stérilisation a été fort bien résolu par Wieringa. En portant la solution de pectine momentanément à 120°C à l'autoclave, on obtient une stérilisation parfaite et la molécule de pectine est encore suffisamment longue pour former un gel assez dur avec le calcium. Pour la neutralisation, il n'en est pas de même. Dans son premier travail, Wieringa n'en parle pas. Dans une seconde note (180) plus importante, l'auteur inclut, à la première couche d'agar, du carbonate disodique qui, selon lui, suffit à la neutralisation, par diffusion dans la couche de pectine. Ceci semble

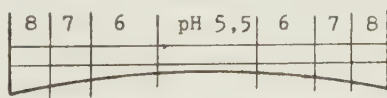


FIG. 8. — Influence de la forme de la boîte de Petri sur le pH du milieu de Wieringa.

être vrai lorsqu'on se sert de boîtes à fond rigoureusement plat. Celles que nous utilisons ici ne le sont presque jamais, mais ont le fond légèrement convexe. L'épaisseur de la couche de gélose est ainsi irrégulière et la neutralisation aussi (l'inclusion de quelques gouttes d'indicateur à pH nous permet de voir les différentes zones de pH de la pectine (fig. 8)). Nous avons résolu cette question en additionnant directement de la soude ou du carbonate disodique à la solution de pectine, avant la stérilisation. La pectine est, certes, plus fortement dépolymérisée, mais la longueur des molécules suffit pour l'obtention de très bons gels. Pour 1 litre de milieu, le milieu de Wieringa contient, dans la première couche, 15 g de gélose dissous dans de l'extrait de terre (1 litre) ; il additionne 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 0,5 g NH_4Cl , 0,5 g d'asparagine et 2 ml d'une solution saturée de CaCl_2 , ainsi que du carbonate disodique. La deuxième couche est une solution de pectine ruban rouge à 20 ‰. Nous avons enrichi ce milieu avec des extraits de végétaux : ce qui favorise la croissance des germes les plus difficiles et augmente le nombre de colonies non pectinolytiques. Nous avons pu faire entre pectinolytiques et non pectinolytiques un rapport plus exact. Voici la composition de ce milieu (W3) (69).

Milieu de Wieringa modifié : W3.

Base d'agar (pour 1 litre de milieu) :

Gélose	15 g
CaCl ₂	5 g
Extrait de terre	700 ml
Eau distillée ou eau de rivière	300 ml

On filtre et on répartit en tubes de 22 mm, à raison de 20 ml par tube. Stérilisation : 20 minutes à 120° C.

Couche de pectine (pour 1 litre de milieu) :

Pectine ruban rouge (unipeptine)	18 g
Bouillon de carottes ou bouillon de pommes de terre filtré	200 ml
Eau distillée	800 ml
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Lessive de soude au 1/10	7 cm ³

Détail de la préparation. — La préparation de la solution de pectine nécessite quelques précautions car les pectines faiblement méthoxylées sont difficilement solubles dans l'eau. Si l'on possède un « Mixer », la pectine se mélangera facilement à la solution, même à froid. Sinon, la pectine sera mise à part dans un bocal de 2 litres tout à fait sec. On mouille alors la pectine avec 35 ml d'alcool éthylique à 96°. La solution contenant les sels minéraux et la soude est chauffée à 70° C et versée d'un seul trait sur la pectine mouillée, qui se met en « solution » instantanément. Il ne faut pas filtrer. On répartit à raison de 10 ml dans des tubes de 14 et la stérilisation se fait en portant l'autoclave à 120° C. Cette température atteinte, on arrête le chauffage et on laisse redescendre la température. La solution de pectine reste liquide mais se solidifiera en 1/2 heure au contact de la couche de gélose solide (boîtes de Petri de 10 cm de diamètre). L'ensemencement s'effectue directement dans la solution de pectine liquide. Lorsque la couche de pectine est solidifiée, il est préférable de laisser sécher les boîtes de Petri pendant 24 heures, sur du papier-filtre stérile. On laisse incuber ensuite 48 heures, à 26° C ou 28° C, et on fait une première lecture (soit 3 jours après l'ensemencement) en notant le nombre de godets creusés par les germes pectinolytiques, leur nature (Bactérie, Actinomycète, Champignon) et le nom-

bre de colonies non pectinolytiques. Une deuxième lecture est nécessaire le 5^e jour, une dernière le 7^e jour de culture.

D'autres auteurs ont fait subir au milieu de Wieringa différentes modifications, valables pour une bonne culture, mais souvent beaucoup plus compliquées à réaliser. G. E. Jones (64) ajoute à la couche de pectine un peu de gélose, ce qui nécessite moins de pectine pour des godets aussi beaux. Toutefois, la manipulation de ces milieux, solides à froid, est plus difficile (pectate de soude alcalin ASP Chemical Co. Ltd.). Dans une note précédente G. E. Jones (63) employait un milieu sur plaques, avec une seule couche de pectine, contenant du calcium pour la solidification, mais la préparation de ces milieux est excessivement compliquée.

D. R. Jones (62), en 1946, utilisant la même pectine a mis au point un milieu similaire sur plaques. Citons enfin la méthode de G. Jacobelli (60) se servant également d'un milieu sur plaques avec une seule couche de pectate de calcium (aucune indication de marque). Malheureusement, ce milieu ne supporte pas plus de 100° C ; or, nous savons que certains germes sporulés comme *B. subtilis* résistent facilement à cette température. D'autre part, la préparation est plus difficile à réaliser que le milieu de Wieringa.

Les milieux sur plaques (et plus spécialement le milieu de Wieringa modifié) offrent certains avantages : une détermination rapide et sommaire de la nature des microorganismes pectinolytiques (Bactérie pigmentée, non pigmentée, Actinomycète, Levure, Champignon), l'isolement très rapide des germes pectinolytiques, la culture de toutes les espèces pectinolytiques connues, enfin la grande sensibilité du gel aux attaques des germes pectinolytiques (la pectine préalablement attaquée par la chaleur et la soude devient sensible aux moindres sécrétions d'enzymes).

Les inconvénients ne sont pas moindres. Il s'avère souvent difficile de dénombrer les godets dans les faibles dilutions où le nombre des colonies non pectinolytiques est élevé. Ainsi, dans quelques cas, la numération des godets dans les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} de nos échantillons de terre nous a été impossible. De plus, ces milieux sur plaques ne s'alignent pas dans la série des milieux en tubes que l'on emploie couramment en microbiologie du sol ; ils ne permettent donc ni l'établissement de courbes de la pectinolyse en fonction du temps, ni la comparaison de la pectinolyse avec les autres fonctions, mais seulement la comparaison de la fonction pectinolytique dans les différents sols. L'encombrement des plaques est aussi plus grand. Pour parer à tout cela, nous avons mis au point, avec M. A. Chavignac (68), un milieu en tubes avec la pectine pour seule source de carbone. L'attaque de la pectine se traduit par la liquéfaction du gel de pectine.

Basé sur le principe de Wieringa, le milieu suivant est réalisé :

Milieu W3t.

A. — *Couche de gélose :*

Gélose	15 g
Chlorure de calcium	5 »
Eau distillée	1 000 cm ³

Après filtration, le milieu est réparti, à raison de 3 cm³ par tube de 22 mm de diamètre, stérilisation : 20 minutes à 120° C.

B. — *Couche de pectine :*

Pectine ruban rouge	8 g
Nitrate d'ammonium	2 »
Solution de Winogradsky	50 cm ³
Extrait de terre	50 »
Eau distillée	900 »
Lessive de soude au 1/10	5 »

Les détails de la préparation et la stérilisation sont les mêmes que pour la solution de pectine du milieu W3. La répartition se fait à raison de 15 cm³, en tubes de 22.

Au moment de l'utilisation, chaque tube de gélose reçoit stérilement (à l'aide d'une pipette de 10 cm³ graduée au 1/100) 2 cm³ de la solution de pectine. Onensemence alors rapidement chaque tube ainsi préparé avec 1 cm³ de dilution de terre. Pour l'obtention d'une courbe régulière, 5 tubes sont nécessaires par dilution. Jusqu'au 10^e jour, on fera une lecture quotidienne en marquant chaque tube bien liquéfié par un signe +, chaque tube avec une liquéfaction faible ou débutante (parfois un simple godet) par un signe ε. Du 10^e au 20^e jour, on peut espacer les lectures de 3 ou 4 jours. Les Bactéries y montrent une liquéfaction nette. Les Champignons, eux, sont souvent beaucoup plus lents. Ils peuvent former un bouchon sur une pectine partiellement liquéfiée ; dans ce cas, on penche le tube et on le tapote légèrement pour voir s'il y a réellement attaque ou non de la pectine. On comparera toujours avec un tube témoinensemencé avec 1 cm³ d'eau distillée stérile. Ce milieu nous a donné entière satisfaction. Il reflète exactement l'image que l'on obtient sur plaques avec le milieu W3. Les Actinomycètes se cultivent cependant plus lentement faute d'extraits végétaux. Mais ils apparaissent en nombre équivalent aux plaques vers le 15^e jour environ d'étuve.

Après deux semaines de cultures, nous avons prélevé 1 cm³ de pectine bien liquéfiée dans quelques tubes ensemencés avec des terres et nous les avons mélangés à des substrats enzymatiques gélifiés par la pectine : la présence d'enzyme se traduit par une forte baisse de viscosité. Nous avons constaté que, lorsqu'il s'agit de cultures mixtes du sol, les enzymes sécrétées disparaissent rapidement. Une terre ensemencée sur W3t nous donne les résultats suivants : les tubes liquéfiés sont marqués par le signe + :

Dilutions	Tubes
—	—
10 ⁻²	+ + + +
10 ⁻³	+ + + +
10 ⁻⁴	+ + - -
10 ⁻⁵	+ + + -
10 ⁻⁶	- - - -

Si nous reportons 1 cm³ de liquide de culture de chaque tube sur un substrat enzymatique gélifié, nous observons des baisses de viscosité (marquée par un signe +) beaucoup moins nombreuses :

Dilutions	Tubes
—	—
10 ⁻²	+ + - -
10 ⁻³	+ + - -
10 ⁻⁴	+ - - -
10 ⁻⁵	+ - - -
10 ⁻⁶	- - - -

Les résultats obtenus avec une telle technique sont donc erronés. Inexactes aussi sont ceux donnés par la mesure de viscosité directe des solutions de culture elles-mêmes, après centrifugation, car la sécrétion éventuelle d'un mucus dans ce milieu de culture va augmenter considérablement la viscosité de la solution attaquée. De plus, c'est une technique longue qui ne peut être employée pour les déterminations courantes.

Des milieux à base de pectine en tubes réalisés par d'autres auteurs, aucun ne nous a satisfait, la pectine employée étant le plus souvent une pectine étrangère difficile à obtenir en France. D. R. Jones (62) utilise le pectate de sodium ASP, de même que W. J. Dowson (32), G. E. Jones (64) emploie un milieu liquide à base de pectate de soude ASP. Pour ce dernier, l'indice d'une pectinolyse serait une baisse de pH traduite par un indicateur ajouté au milieu. Mais rappelons que, chez les aérobies, l'attaque polygalacturonidasique ne se traduit que rarement par une baisse de pH. Pour la plupart des germes des genres

Pseudomonas et *Empedobacter* cultivés sur pectine, nous n'avons constaté, malgré une forte activité polygalacturonidase, aucune baisse de pH si minime soit-elle.

2° Activité pectine-estérase d'un sol.

Cette activité n'est que secondaire dans la démolition de la molécule de pectine ; aussi, bien des microorganismes pectinolytiques en sont-ils dépourvus. Il serait toutefois intéressant d'apprécier cette activité dans le sol. En effet, la plupart des Bactéries pectinolytiques phytopathogènes la possède (mais aussi de nombreux champignons et Actinomycètes banaux). Il est facile de mesurer cette activité pour des germes en culture pure : soit par la méthode de Smith (151) ou Kertesz (76) pour les Bactéries, soit par la technique d'Echandi et collaborateurs (37) pour les Champignons. Nous avons pensé qu'il était possible de transposer ces techniques en microbiologie du sol (69). Des difficultés apparaissent cependant : comme nous l'avons vu plus haut, les enzymes pectinolytiques sécrétées lors d'une culture mixte de germes du sol sont en partie détruites. Il est donc impossible d'agir indirectement. Par mesure directe, les résultats ne sont pas meilleurs : au début d'une culture de germes du sol, sur un milieu à base de pectine comme seule source de carbone, il y a une majorité de pectinolytiques. Cependant, très vite, un grand nombre d'autres germes, qui profitent des métabolites des pectinolytiques, se mettent également à proliférer, masquant bien souvent l'acidification produite par la désestérification de la pectine. Nous ne pouvons donc actuellement mesurer cette fonction du sol par une méthode simple et rapide.

3° Activité « protopectinase » d'un sol.

Qu'est-ce que la protopectine ? Une substance fort mal définie, ainsi qu'il est dit dans notre rappel : les différentes plantes possèdent des protopectines diverses. Un germe qui attaque la pomme de terre n'en fera pas autant pour la carotte de même qu'un germe rouissant le lin ne sera peut-être pas capable de ramollir une pomme de terre (143). L'enzyme n'est pas mieux connue. Il est fort probable que cette enzyme hypothétique puisse être confondue avec les polygalacturonidases. Compte tenu de ses restrictions, revoyons les différentes techniques. Pour mettre en évidence les germes pectinolytiques des sols de forêts, Duggeli et Stöckli (35) (158) emploient une technique bonne en soi, mais qu'ils ont mal interprétée. Des tubes de culture contenant un

milieu salin plus un morceau de pomme de terre sont ensemencés avec les dilutions de terres. Selon les auteurs, le dégagement gazeux et la décomposition des morceaux de tubercule sont les signes d'une activité pectinolytique positive. Nous sommes d'accord quant à la décomposition des morceaux mais non sur le dégagement gazeux qui peut aussi bien provenir de germes amylolytiques par exemple. Lambina (82) ensemence des dilutions de terres sur un bouillon de pommes de terre et teste ensuite le liquide de culture sur des fragments de pommes de terre crues. Le ramollissement de ces fragments indique la présence d'une « enzyme protopectinasique ». Rappelons, encore une fois, que cette mesure indirecte est valable pour des germes en culture pure et non pas dans une culture mixte de germes du sol où les exoenzymes disparaissent souvent rapidement. Nous avons proposé une technique de mesure directe qui semble valable (69).

On prépare des petits cubes de carottes ou de pommes de terre de 1 cm³ que l'on place dans des tubes de 14 ou de 22 mm (1 cube par tube) contenant une solution saline répartie à 2 cm de hauteur environ.

Solution saline :

Nitrate d'ammonium	2 g
Extraits de terre	50 cm ³
Winogradsky 1/20	50 »
Eau distillée	900 »

La stérilisation se fait comme pour la pectine, en portant l'autoclave momentanément à 120° C. Ensemencement avec des dilutions de terre (1 cm³ par tube). L'attaque d'un germe protopectinasique se traduit par le ramollissement du cube végétal que l'on apprécie en exerçant sur lui une faible pression, à l'aide d'une pipette. On comparera toujours avec un cube témoin non ensemencé.

La stérilisation par la chaleur ne peut être évitée que si l'on place aseptiquement, dans les tubes, les cubes découpés au préalable stérilement dans le tubercule ou la racine stérilisée elle-même extérieurement par le chlorure mercurique. Mais c'est une opération longue et délicate.

Kerr (74) a mis au point une méthode originale pour dénombrer les germes phytopathogènes pectinolytiques du sol : de petites pommes de terre sans blessure sont stérilisées en surface par de l'hypochlorite de soude et immergées dans des tubes contenant une solution saline. Les germes phytopathogènes pectinolytiques pénètrent, selon l'auteur, par les lenticelles du tubercule et y provoquent une pourriture molle, alors que les germes pectinolytiques banaux en sont incapables. Nous pensons confirmer cette technique par le fait suivant : *Clostridium polymyxa*, saprophyte banal, ne peut pas attaquer une pomme de terre entière,

ni même légèrement blessée. La blessure doit avoir une grande surface pour que ce germe puisse provoquer une pourriture molle. Une blessure profonde mais sans surface se cicatrise rapidement même sous l'eau et le germe n'a plus de prise sur le tubercule.

B. — MICROORGANISMES ANAÉROBES

1° *Activité polygalacturonidasique ou pectinolytique proprement dite.*

Comme pour les germes aérobies, il eût été souhaitable de pouvoir obtenir des colonies d'anaérobies pectinolytiques sur boîtes de Petri. Toutes nos tentatives ont échoué jusqu'à ce jour, l'élimination de l'oxygène posant des problèmes difficiles à résoudre.

La baisse de pH et la production d'acidité n'est pas plus significative chez les anaérobies lors de la pectinolyse que chez les aérobies ; car les anaérobies pectinolytiques ne se cultivent que sur des milieux com-



FIG. 9. — Anaérobiose en boîte de Petri.

plexes, organiques et produisent, avec ou sans pectine, une forte baisse de pH. Raynaud et collaborateurs (134) ont démontré que, même dans un milieu où la seule source d'hydrates de carbone est la pectine, il y a peu de corrélation entre l'acidité totale et le pH d'une part et la pectinolyse d'autre part : *Plectridium pectinovorum*, qui digère 39 % de la pectine, abaisse le pH à 6,4 alors que *Clostridium sporogenes*, non pectinolytique, l'abaisse à 6,3. Le pouvoir réducteur augmente lors de la pectinolyse et plus spécialement chez les anaérobies qui sont en général des pectinolytiques puissants. En ajoutant un indicateur de rH au milieu, nous pensons que le virage de l'indicateur autour d'une colonie indiquerait une pectinolyse certaine. Mais, ici encore, la réaction n'est pas spécifique, de nombreux anaérobies abaissent le rH avec ou sans pectine. Plusieurs essais ont été effectués dans ce sens : les bactéries sont ensemencées directement dans le milieu liquide à 45° C ; celui-ci est alors coulé en boîtes de Petri en anaérobiose et incubé à 30° C (fig. 9).

Les indicateurs de pH ajoutés au milieu sont les suivants :

Rouge neutre	1 % d'une solution à 1 %
Safranine	2 » »
Vert janus	1 » »
Indigo	1 » »
Chlorophylle	3 g de pâte dans 100 cm ³ d'alcool à 30° 4 % de cette solution
Crodex	4 % d'une solution à 1 % (triphényltétrazolium-bromure)

Le milieu de base est le suivant :

Pectine de pomme	0,5 %
Extrait de levure (Difco)	0,5 »
Agar	1 »
Bouillon de pommes de terre...	700 cm ³
Eau de chaux	- 300 »

Sont ensemencés : *Clostridium aurantibutyricum*, *Cl. pectinolyticum* (C₈), *Pl. pectinovorum* (PC), *Plectridium virens* (PN6) et *W. perfringens*, ce dernier comme témoin.

Au bout de 24 à 48 heures, on observe pour le rouge neutre la safranine et le vert janus, une zone de décoloration intense autour des colonies de tous ces germes, y compris *W. perfringens*. La décoloration est donc nette mais non spécifique de la pectinolyse. L'indigo et la chlorophylle ne donnent aucun virage ; le crodex est toxique même à faibles doses.

D'autres expériences ont été tentées pour déceler la pectinolyse anaérobie sur boîte de Petri. La première repose sur le fait qu'avec un excès de calcium la pectine déméthylée est précipitée ; elle devient alors visible dans le milieu. La pectinolyse doit donc se traduire par une zone de clarification autour de la colonie.

Les colonies de *Cl. polymyxa* donnent de très beaux halos d'éclaircissement mais *Pl. pectinovorum* n'en produit aucun. Cette méthode, bien qu'ayant donné quelques résultats positifs nets, est donc trop peu sensible : les pectinolytiques moyens comme *Pl. pectinovorum* qui d'habitude abaissent fortement la viscosité d'un gel de pectine ne montrent aucun résultat visible. De plus, *W. perfringens*, non pectinolytique, présente certaines zones d'éclaircissement très faibles qui ne devraient pas être.

Nous nous sommes tournés vers une dernière solution : employer la formule Wieringa. Nous savons que le milieu est sensible aux attaques

les plus faibles, cependant l'élimination de l'oxygène pose de grands problèmes. Le milieu modifié suivant est réalisé :

- *base d'agar* : la même que pour les aérobies ;
- *couche de pectine* :

Pectine ruban rouge	20 g
Extrait de levure	5 »
Bouillon de pommes de terre....	1 000 cm ³

Neutraliser avec de la lessive de soude au 1/10 et stériliser comme pour les solutions de pectine. Les milieux sont utilisés soit directement après leur sortie d'autoclave, l'air a ainsi été chassé, soit après stockage au laboratoire et addition de réductose (1,5 % de réductose Serpasteur) ou d'acide ascorbique (0,3 cm³ d'une solution d'ascorbate de soude à 1 % en eau distillée, par tube de 10 cm³). La base d'agar est toujours ou

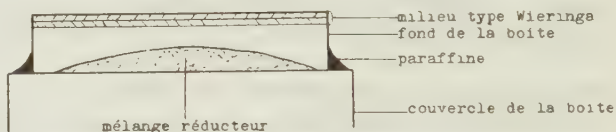


FIG. 10. — Anaérobiose en boîte de Petri : technique de Mossel.

« régénérée » (ébullition de 30 minutes au bain-marie), ou additionnée d'un réducteur.

Le milieu est ensemencé par les germes pectinolytiques ou des dilutions de terres. Nous avons alors employé deux techniques d'élimination de l'oxygène. Dans la première, une fois les milieux solidifiés, on met la boîte dans un dessiccateur à vide, avec un petit morceau de neige carbonique. On fait le vide à 50 cm de mercure jusqu'à ce que la neige carbonique placée dans le fond du récipient soit complètement évaporée ; à ce moment, le dessiccateur est fermé (incubation à 30° C). L'atmosphère, à l'intérieur du dessiccateur est saturée de gaz carbonique et pratiquement sans oxygène. On peut additionner aussi un godet contenant du pyrogallol imprégné d'une solution alcaline, pour éliminer toute trace d'oxygène. La deuxième technique est celle préconisée par Mossel et collaborateurs (104) qui consiste à travailler avec des boîtes individuelles fermées chacune par une couche de paraffine et renfermant un petit sachet de papier rempli d'un mélange en poudre de pyrogallol, de carbonate bipotassique et de terre de diatomée. L'oxygène est ainsi fixé lentement (4 heures) et de manière efficace (fig. 10). Avec ces deux techniques nous avons obtenu des résultats positifs ; les pectino-

lytiques creusent dans les plaques des godets visibles. La croissance est extrêmement irrégulière aussi bien pour les souches pures de collection que pour les dilutions de terres. Sur 2 ou 3 boîtes, ensemencées avec la même dilution ou avec le même germe, une boîte va donner des cultures bien positives, alors que les deux autres restent sans culture. Nous ne pouvons actuellement pas expliquer ces faits. Ajoutons enfin que ces méthodes sont longues et difficiles à réaliser : pour faire une lecture, il faut chaque fois ouvrir le dessiccateur ou la boîte, ce qui implique de refaire le vide ou de réintroduire un sachet de réactif si l'on veut prolonger la culture.

De toute façon, il faut passer par les géloses profondes pour l'isolement définitif.

Aucun de ces milieux sur plaques ne nous ayant donné satisfaction, nous nous sommes tournés vers les milieux en tubes que nous avons adoptés définitivement. La culture est rapide et stable. La lecture s'opère facilement car une attaque même faible de la pectine se traduit par une baisse de viscosité visible, du gel de pectine. L'élimination de l'oxygène s'effectue avec n'importe quelle pompe à vide et ne pose aucun problème. Seul désavantage : les colonies ne sont pas séparées et les isollements de souches pectinolytiques sont plus longs et plus difficiles quoique possibles dans la plupart des cas. Deux milieux ont retenu notre attention : l'un est neutralisé avant stérilisation et stérilisé par tyndallisation : 3 chauffages de 1/2 heure à 70° C à 24 heures d'intervalle :

Pectine ruban rouge	4 g
Extrait de levure	5 »
Bouillon de pommes de terre....	900 cm ³
Eau de chaux	100 »

La préparation se fait comme pour toutes les solutions de pectine avec un Mixer ou en mouillant la pectine avec un peu d'alcool (p. 50). Nous avons employé ce milieu dans l'étude des souches pectinolytiques des intestins de poissons (133). Deux inconvénients sont à signaler : 1° Le taux de pectine est trop peu élevé ; le dégagement gazeux de certains anaérobies peut briser le gel et provoquer une fausse liquéfaction apparente, liquéfaction qui reste toujours faible comparée à celle provoquée par de vrais pectinolytiques. 2° La tyndallisation ne suffit pas à stériliser parfaitement les milieux ; un certain pourcentage de tubes se souillent lorsqu'on teste la stérilité à l'étuve à 30° C. Pour parer à ces deux défauts, il faut donc avec le milieu Vr augmenter la quantité de pectine d'une part et la chaleur de stérilisation d'autre part. Avec cette dernière modification, la neutralisation ne peut se faire qu'après stérilisation pour éviter une perte de viscosité trop grande.

Milieu Vr (69) :

Pectine ruban rouge	12-15 g
Extrait de levure (Difco ou Byla).	5 »
Bouillon de pommes de terre....	1 000 cm ³

Préparation. — La solution est versée à 70° C sur la pectine mouillée avec 25 cm³ d'alcool. Le pH du milieu est alors à 5. On répartit ensuite en tubes de 1/4 à raison de 6 cm³ de milieu par tube. La stérilisation se fait, comme pour tous les milieux à la pectine, en portant l'autoclave momentanément à 120° C. Le milieu peut être alors stocké au laboratoire. Avant l'ensemencement des dilutions de terres ou d'anaérobies pectinolytiques, on « régénère » les tubes pendant 20 minutes, au bain-marie bouillant. De cette façon, l'oxygène est chassé. On les laisse refroidir à 70° C et le milieu est neutralisé en additionnant à chaque tube, aseptiquement, 0,1 cm³ d'une solution à 4 % de carbonate disodique stérilisée par filtration sur bougie. Les tubes sont ensemencés à 30° C et les dilutions de terres sont mélangées au milieu en agitant très doucement ; chaque tube est ensuite étranglé au chalumeau et scellé sous vide. De cette façon, l'anaérobiose est assurée de façon rigoureuse, ce qui permet la culture des souches les plus difficiles et inhibe toute croissance aérobie qui fausserait les résultats. Le nombre de germes pectinolytiques par gramme de terre est donné par les tables de McCready (119).

Le milieu reste semi-liquide à l'étuve (30° C), la culture des germes est ainsi facilitée. Pour une bonne lecture, il est parfois nécessaire de porter les cultures à la glacière pendant 2 heures. Quelques détails sont à noter quant à la composition de ce milieu. La quantité de pectine est variable pour de multiples raisons : les pectines des différents lots n'ont pas toujours exactement la même viscosité ; l'extrait de levure Difco, davantage purifié, possède une concentration en ions métalliques polyvalents moindre que la levure Byla ; le gel sera donc plus rigide en présence de cette dernière sorte. Il faudra abaisser la concentration en pectine avec la levure Byla. Si l'on remplace le bouillon de pommes de terre par un bouillon d'autres végétaux (carottes, betteraves), la viscosité changera aussi. Enfin, la puissance et la rapidité de l'autoclave interviennent : certains autoclaves montent et descendent rapidement alors que d'autres sont plus lents ; la prolongation de la durée de stérilisation va entraîner une baisse de viscosité supplémentaire. Pour avoir de bons résultats le gel doit rester de préférence semi-liquide pendant 48 heures et même davantage. Un gel trop rigide inhibe partiellement les cultures.

Nous avons essayé de neutraliser les solutions par du carbonate de cal-

cium introduit avant la stérilisation. La neutralisation se fait bien (pH 6,5), mais la pectine devient beaucoup plus difficile à attaquer et les lectures sont moins bonnes.

2° *Activité pectine-estérasique anaérobie.*

Nous retrouvons les mêmes ennuis que pour les germes aérobies en culture mixte. Impossibilité de tester l'activité indirectement à cause des pertes d'enzymes, et directement, car la plupart des anaérobies abaissent le pH d'un milieu de culture complexe.

3° *Activité « protopectinasique » anaérobie.*

Nous ne reviendrons pas sur les travaux de Lambina (82) et de Dügelli (35) qui peuvent être adaptés à la culture d'anaérobies avec toutes les restrictions qui s'imposent. Nous avons mis au point un milieu (69) à base de petits cubes de pommes de terre ou de carottes immergés dans la solution suivante :

Bouillon de pommes de terre....	500 cm ³
Eau distillée	500 »
Extrait de levure (Difco ou Byla).	5 g
Neutralisation à la soude si nécessaire.	

Les solutions sont réparties à raison de 6 cm³ par tube de 14 mm et le milieu stérilisé comme pour les solutions de pectine. Après ensemencement des dilutions ou des germes pectinolytiques, on étrangle les tubes au chalumeau et on scelle sous vide. La présence d'une culture pectinolytique se traduit par le ramollissement du morceau de tissu végétal qui peut aller jusqu'à la désintégration et la digestion totales.

CHAPITRE II

ISOLEMENT, CULTURE EN SÉRIE ET CONSERVATION DES BACTÉRIES PECTINOLYTIQUES

A. — AÉROBIES

La technique des plaques de Wieringa permet l'isolement facile et rapide d'un grand nombre de germes pectinolytiques aérobies. On choisit, s'il est possible, une colonie pectinolytique suffisamment isolée et on la repique avec une öse sur une gélose inclinée de composition suivante :

Bouillon de pommes de terre (p. 64).	1 000 cm ³
Extrait de levure (Difco ou Byla)	5 g
Gélose lavée	22 »

Répartition à raison de 3 cm³ en tubes de 14 mm ; stérilisation : 1/2 heure à 115° C. On laisse refroidir les tubes dans la position inclinée.

Toutes les espèces pectinolytiques du sol se cultivent aisément sur ce milieu ; il ne faut pas les conserver plus d'une semaine sur gélose inclinée mais les transférer après l'obtention d'une culture pure, sur bouillon pdt-I (p. 64) ou sur bpdt (p. 64). La température de culture optimum pour les aérobies pectinolytiques est de 25° à 28° C. On repique ensuite le germe sur W3t (p. 52) pour être sûr que l'on est bien en présence du germe pectinolytique isolé primitivement. La conservation se fait sur bouillon pdt-I ou sur bouillon b-pdt ou mieux encore sur Vr, toujours à la glacière et *jamais* sur milieu à base de viande ou eau peptonée.

On repiquera tous les mois les espèces fragiles (*Myxobactéries*, *Achromobacter*, *Rhodobactériacées*) ; tous les 6 mois, les souches moins fra-

giles (*Empedobacter*, sporulés autres que *B. subtilis*), et tous les ans les espèces les plus résistantes (certains *Pseudomonas*, *B. subtilis*). La lyophilisation est le meilleur mode de conservation mais nous ne pouvons pas encore donner de résultats certains, le laps de temps écoulé depuis la lyophilisation de nos souches étant encore trop court.

B. — ANAÉROBIES

L'isolement de cultures pures à partir du milieu Vr ne peut se faire qu'indirectement : on prend un tube à pectinolyse positive et bien avancée mais non terminée (l'isolement à partir de vieilles cultures ne donne que peu de résultats). On ouvre le tube avec précaution en l'enveloppant dans un morceau d'étoffe stérile et en frappant un petit coup sec, avec un scalpel ou autre instrument, sur l'effilure du tube. L'opérateur doit porter des lunettes et de préférence des gants pour parer aux dangers d'explosions violentes qui sont fréquentes. On emploie alors la technique classique des géloses profondes (131) mais on ne peut, dans aucun cas, se servir de géloses à base de viande ou de peptone.

Milieu :

Gélose lavée	10 g
Extrait de levure (Byla ou Difco)	5 »
Bouillon de pommes de terre filtré ou de carottes	1 000 cm ³

Neutraliser à la soude si nécessaire.

La répartition se fait en tubes de 8 mm de diamètre, sur une hauteur de 10 cm (5 cm³). Stérilisation : 1/2 heure à 115° C. Au moment de l'emploi, 12 géloses sont régénérées 20 minutes à 100° C et maintenues ensuite dans un bain-marie à 45° C.

1-2 cm³ de culture du milieu Vr sont alors transférés dans un tube de milieu pdt-1 (voir plus bas) régénéré et refroidi. Dans ce deuxième tube qui contient la culture pectinolytique diluée, on trempe une pipette stérile que l'on passe successivement sur les 12 géloses sans recharger la pipette dans le tube initial. Les géloses sont aussitôt immergées dans un bac d'eau froide. On incube à 30° C. Les différentes sortes de colonies sont prélevées en cassant, avec une lime, le tube de gélose juste au-dessus de la colonie. Elles sont repiquées avec une pipette dans du bouillon pommes de terre-levure (pdt-1) ou sur bouillie de pommes de terre (b-pdt), tous deux régénérés et refroidis. Les tubes sont ensuite scellés

sous vide et incubés à 30° C. Les cultures positives sont repiquées en milieu Vr pour tester l'activité pectinolytique des différentes souches.

La culture optimum des anaérobies se fait entre 30° et 37° C.

— *Bouillon de pommes de terre (*)* :

500 g de pommes de terre sont coupés en morceaux et bouillis dans 1 litre d'eau (éviter l'eau de conduite l'été) pendant 30 minutes. Réajuster au poids de départ, décanner le liquide. Stérilisation 1/2 heure à 110° C.

— *Bouillon de pommes de terre-levure (pdt-l)* :

Ajouter 5 g d'extrait de levure Byla ou Difco pour 1 litre de bouillon de pommes de terre. Répartir à raison de 6 cm³, en tubes de 14, neutraliser si nécessaire, stériliser 1/2 heure à 110° C.

— *Bouillon avec purée de pommes de terre (bpdt)* :

125 g de pommes de terre pour 1 litre d'eau. Faire bouillir pendant 1/2 heure, réajuster au poids de départ. Passer au moulin à légumes ou au Mixer et répartir le tout en agitant, à raison de 6 cm³ par tube de 14 ; stérilisation : 1/2 heure à 110° C.

— *Bouillon de carottes* :

Couper 1 kg de carottes en rondelles. Faire bouillir pendant 2 heures dans 2 litres d'eau et réajuster au poids de départ. Décanner et neutraliser à la soude ; stérilisation : 1/2 heure à 110° C.

Le bouillon avec purée de pommes de terre (bpdt) est le milieu de culture qui conserve le mieux les souches. La plupart s'y conservent un an et davantage et toutes se cultivent avec abondance. C'est aussi un milieu excellent pour la production d'enzymes. Le milieu pomme de terre-levure (pdt-l) convient également bien, mais les souches s'y conservent moins longtemps. Il faut l'employer lorsque l'on travaille régulièrement avec les mêmes souches. La lyophilisation des germes enrobés dans du lait a donné de très bons résultats pour la conservation des souches.

(*) Les milieux suivants ont été mis au point dans le Service des anaérobies, sous la direction de M. le Professeur A.-R. Prévot.

CONCLUSIONS DES CHAPITRES I ET II

La liquéfaction ou la baisse de viscosité d'un gel de pectine sont les seuls tests valables pour mettre en évidence la dépolymérisation de la molécule de pectine. La pectine employée doit avoir de longues chaînes (pectine de pomme ou de citron). La molécule sera suffisamment déméthylée pour obtenir de bons gels avec les cations polyvalents et plus spécialement le calcium. Nous préconisons, en France, l'emploi de pectine de pomme « ruban rouge » fabriquée par Unipectine.

Il faut tenir compte de la fragilité de la molécule de pectine. La stérilisation des milieux à base de pectine se fait toujours en portant l'autoclave momentanément à 120° C. La neutralisation par la soude peut s'effectuer avant la stérilisation si l'on est en présence de milieux du type Wieringa, après stérilisation s'il s'agit de milieu Vr. Dans ce cas, chaque tube est neutralisé séparément et stérilement par une solution de soude diluée.

Pour l'étude des germes pectinolytiques *aérobies*, dans une terre ou d'autres substrats naturels, nous proposons deux milieux reposant sur le principe de Wieringa : le premier, W3, en boîtes (p. 50) est destiné, avant tout, à des *buts écologiques* pour l'appréciation *qualitative* des divers organismes pectinolytiques. L'observation des plaques procure immédiatement une image d'ensemble de la microflore pectinolytique du substrat étudié et l'isolement des germes se fait aisément. Le deuxième milieu, W3t, en tubes a été élaboré pour la mesure *quantitative* de l'activité pectinolytique. Il s'aligne parfaitement avec les techniques actuelles de numération de la microbiologie du sol permettant ainsi de comparer la pectinolyse aux autres fonctions. Il est évident que le milieu W3 donne aussi une idée sommaire de la quantité de ces germes tout comme le milieu W3t peut fournir des indications sur le plan qualitatif.

Pour la recherche des *anaérobies*, il aurait été souhaitable de mettre au point un milieu en boîte. L'élimination de l'oxygène dans ces milieux pose toutefois des problèmes difficiles, c'est pourquoi nous préférons le milieu Vr (p. 60) réparti en tubes. Ceux-ci, scellés sous vide, permettent la culture de tous les *anaérobies*. Si l'étude porte sur une terre, la pectinolyse s'opère d'une façon régulière en commençant par les dilutions les plus faibles. Lorsque *Cl. polymyxa* est dominant, on le reconnaît d'emblée par sa culture en forme de colonne visqueuse blanche. La reconnaissance des autres *anaérobies* se fait par l'isolement des différents germes en passant par les géloses profondes.

Pour les pectine-méthylestérases, nous avons vu qu'il était impossible de mettre cette fonction mineure dans le sol, en évidence.

Les protopectinases, enzymes hypothétiques, vraisemblablement identiques aux polygalacturonidases peuvent être testées sur des fragments de tissus végétaux (carotte, pomme de terre, etc.) stérilisés de la même manière que la pectine.

Nous retiendrons aussi le milieu de Kerr pour l'analyse des germes pectinolytiques phytopathogènes.

Tous les microorganismes pectinolytiques isolés sont cultivés sur des milieux exclusivement végétaux, surtout à base de pomme de terre ou de carotte. D'autres végétaux peu coûteux peuvent entrer dans la composition des milieux de culture (betteraves, maïs, etc.).

CHAPITRE III

PRÉLÈVEMENT, ANALYSE PHYSICOCHIMIQUE, ENSEMENCEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SOLS (*)

Prélèvements. — Ils se font selon la technique classique de la microbiologie du sol. On se munit d'un pot-ban ou de n'importe quel récipient stérile à large ouverture. Avec une cuillère stérile ou un autre instrument, on prend un minimum de 200 g de terre prélevés à 5 ou 10 endroits différents du même terrain. Le profil du sol sera étudié en même temps à l'aide d'une petite tranchée. Il faut noter le lieu du prélèvement que l'on décrit sommairement, la position géographique, l'ensoleillement, la pluviosité, l'humidité habituelle du sol, la température moyenne et la flore dominante. On examine ensuite la texture de la terre, sa couleur, la présence ou l'absence de débris végétaux.

Ensemencements. — Ils doivent se faire le plus rapidement possible après le prélèvement : dans les 24 heures et, au maximum, après trois semaines de conservation au laboratoire. Il est préférable de porter les boues à la glacière si elles ne peuvent être analysées dans les 48 heures qui suivent le prélèvement.

L'échantillon de terre est d'abord homogénéisé puis tamisé. On en pèse 1 g que l'on broie dans un mortier stérile ; puis le broyat est mélangé à 9 cm³ d'eau distillée stérile. Cette première dilution sert à la préparation des suspensions-dilutions suivantes, effectuées de 10 en 10, à l'aide de pipettes de 1 cm³ stériles.

Analyse physicochimique de l'échantillon.

pH. — Il doit être mesuré aussitôt que possible après le prélèvement et avant la dessiccation. On pèse 5 g de l'échantillon homogénéisé que l'on broie et suspend dans 12,5 cm³ d'eau distillée. On fait ensuite la

(*) J. POCHON, *Techniques d'analyses de microbiologie du sol*, Masson et C^{ie}, Paris, 1954.

lecture, avant toute sédimentation, avec un pH-mètre à électrode de verre.

Proportion d'eau. — Peser 10 g de l'échantillon homogénéisé, dessécher jusqu'à poids constant à l'étuve à 90° C. Peser. La différence entre le poids sec et le poids frais représente le pourcentage d'eau.

Dosage de carbone organique. — Évaluation par chromimétrie à froid, selon la méthode de Ann modifiée.

Principe : oxydation à froid par le bichromate de potassium et titrage en retour par le sel de Mohr.

Indicateur : diphénylamine.

Prise d'essai : 1 g de terre sèche et homogénéisée.

Dosage de l'azote total. — Technique de Kjeldahl. Peser 0,1 g de terre homogénéisée et séchée et la mélanger dans un matras de Kjeldahl de 30 cm³ à 2,5 cm³ d'acide sulfurique concentré et à une pincée de catalyseur (sélénium et sulfate de K ou sulfate de potassium et oxyde de mercure). Faire bouillir jusqu'à décoloration complète du mélange. Distiller, en présence de soude, dans un appareil type Markham pour Micro Kjeldahl et titrer avec l'acide sulfurique N/70.

Indicateur : mélange de 50 cm³ d'une solution à 0,05 % de bleu de méthylène et de 50 cm³ d'une solution à 1 % de rouge de méthyle.

Dosage de l'humus. — Selon la méthode de Chaminade : extraction par l'oxalate d'ammonium à 3 %. Précipitation par H₂SO₄. Redissolution par la soude diluée et titrage par manganimétrie.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DE DIFFÉRENTS SOLS,
BOUES ET AUTRES SUBSTRATS NATURELS

CHAPITRE PREMIER

ÉCHANTILLONS FRANÇAIS

Technique d'étude. — Les échantillons sont analysés par la technique des plaques W3 pour les aérobies. Nous reportons, par boîte et par dilution, la moyenne de colonies des Bactéries, des Actinomycètes, des Champignons pectinolytiques et de la microflore totale. Le nombre approximatif (N. A.) des microorganismes dans 1 g de matière analysée est calculé par simple multiplication du nombre de colonies avec l'inverse de la dilution. Nous prendrons très souvent la moyenne du N. A. donné par la dilution comprenant de 10 à 100 colonies et du N. A. qui contient de 1 à 10 colonies. Nous n'avons pas pu appliquer la méthode de Laverigne (119) car elle ne convenait pas à la plupart de nos analyses.

Pour les anaérobies (milieu. Vr), chaque tube attaqué est indiqué par un signe + ou par P (*Clostridium polymyxa*) (en général 4 tubes par dilution, chacun étant ensemencé avec 0,5 cm³ de la dilution). Le N. A. par gramme de matière analysée est calculé par les tables de McReady (119).

Les rapports indiqués sont les quotients obtenus par la division du nombre total de microorganismes, avec le nombre d'une des catégories de microorganismes pectinolytiques.

I. — *L'air du laboratoire.*

La manipulation des terres pour la préparation des dilutions, l'ouverture fréquente des boîtes pour une observation meilleure des godets ou plages de liquéfaction pourraient être des causes de souillures abondantes. Celles-ci conduiraient à l'isolement de microorganismes pectinolytiques ne provenant pas de l'échantillon de terre ensemencé.

Nous avons donc, en premier lieu, analysé l'air du laboratoire en y exposant les milieux W3 pendant des temps variés (tableau V).

La manipulation des terres pour la préparation des dilutions n'excède jamais 15 minutes. Nous n'avons donc aucune chance de retrouver les germes de l'air dans la dilution 10^{-3} de la terre à étudier.

TABLEAU V

Temps	Moyenne du nombre de colonies par boîte					Nombre de boîtes
	Champ. Act. pectinolytiques	Bactéries	Champ. non pectinolytiques	Bactéries	Total des microorg.	
0 seconde	0	0	0	0	0	2
10 secondes	0	0	0	1	1	2
20 »	0,5 Act. 0,5 champ.	0	0	5,5	6,5	2
40 »	0	0	0	4	4	2
2 minutes	0,5 champ.	0,5	0	8,5	9,5	2
4 »	1 »	0	0,5	12,5	14	2
15 »	1,5 Act. 0,5 champ.	0	1	16	19	4
6 heures	12,6 champ.	0,2	49	44	105,8	5

De même, l'ouverture des boîtes pour une meilleure visibilité des godets (environ 30 secondes) ne provoque pratiquement pas de risque de souillures pectinolytiques.

Les deux colonies de Bactéries pectinolytiques isolées au cours de cet essai appartiennent l'une à *Cl. polymyxa*, l'autre au genre *Rhodopseudomonas* (*Athiorhodaceæ*).

II. — Litières végétales, terreaux.

Rappelons brièvement les travaux de Haumann (56) sur le rouissage du lin au sol, les germes les plus courants sur ce substrat sont : *Cladosporium herbarum* ; *E. coli*, *B. pumilus*, *B. subtilis* et l'Actinomycète *S. forsteri*. Haumann conclut que le rouissage à l'air n'est pas dû à des agents spécifiques mais à des germes banaux de l'air et du sol.

Les expériences de Wieringa (180) et de Wieringa et Smit (181) nous montrent que le premier hôte pectinolytique des feuilles mortes est *Pullularia pullulans*, pectinolytique énergique. Avec le vieillissement de la litière, *P. pullulans* disparaît laissant la place à d'autres Champignons, Bactéries et Actinomycètes.

Dans tous ces travaux, la question des Bactéries anaérobies pectinolytiques est négligée, le type des Bactéries formant la microflore pectinolytique secondaire n'est pas précisé.

Ces deux points ont fait l'objet d'une étude portant sur 5 échantillons de litières diverses, voici les résultats :

1. — Feuilles de chênes fraîchement tombées (1 semaine) ne touchant pas encore le sol, forte humidité (L1).

W3 L1.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	6,5	0	23	163
10^{-4}	0	0	4	21
10^{-5}	0	0	0,5	2
10^{-6}	0	0	0	0
N. A.	6 500	0	31 500	205 000
Rapports	1 : 315	—	1 : 65	

Vr L1.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10^{-1}	P + — —	+ + + +
10^{-2}	— — — —	+ + + +
10^{-3}	— — — —	+ — — —
10^{-4}	— — — —	— — — —
10^{-5}	— — — —	— — — —
N. A.	12	700
Rapport	1 : 58	

Dans cette litière jeune, nous tirons les mêmes conclusions que Wieringa : prédominance des Champignons pectinolytiques (ici *Pullularia pullulans*) et quelques Bactéries aérobies appartenant aux *Empedobacter*. Une souche a été identifiée comme *E. aquatilis* (0,5 colonie à 10^{-3}). Les autres souches, de loin les plus nombreuses (6 colonies à 10^{-3}), n'ont pas pu être isolées mais appartiennent vraisemblablement à l'espèce nouvelle : *Empedobacter viride*.

Remarquons que les Actinomycètes sont absents et les Bactéries anaérobies encore fort peu nombreuses. Parmi les anaérobies pectino-

lytiques pratiquement inactifs à cause de leur petit nombre, nous avons reconnu *Cl. polymyxa*.

2. — Litière de feuilles de chêne, de charme et de robinier. Les feuilles partiellement décomposées reposent en une mince couche sur un sol neutre (Bois de Vincennes) ; forte humidité (L2).

W3 L2.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	Très nombreuses	?	Nombreux	Innombrables
10^{-4}	Nombreuses	?	11	Très nombreuses
10^{-5}	12,5	0,5	2	Nombreuses
10^{-6}	1,5	0	0,5	71
N. A.	1 375 000	?	155 000	71 millions
Rapports	1 : 51,6	—	1 : 458	

Vr L2.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10^{-1}	(+)	(+)	—	—	+	+	+	+
10^{-2}	+	(+)	—	—	—	+	+	—
10^{-3}	—	—	—	—	+	+	+	+
10^{-4}	(+)	—	—	—	+	+	+	+
10^{-5}	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	32				50 000			
Rapport	1 : 1 562							

A nouveau, nous faisons les mêmes constatations globales que Wieringa : *P. pullulans* a disparu, laissant la place à des Champignons toujours nombreux, mais très variés.

Quant aux Bactéries pectinolytiques aérobies, elles se trouvent en nombre considérable dans cette litière et appartiennent toutes au genre *Empedobacter*, et à l'espèce *E. pectinovorum* (Dorey). La microflore bactérienne totale ayant fortement augmenté, le rapport entre elle et les Bactéries pectinolytiques est resté dans le même ordre de grandeur

que dans la litière précédente. Les Champignons qui étaient pourtant plus nombreux que dans cette dernière semblent, de ce fait, en régression. Les Actinomycètes sont peu nombreux. Les Bactéries anaérobies pectinolytiques et les autres anaérobies sont en très faible minorité. Les pectinolytiques anaérobies sont pour la plupart des anaérobies facultatifs, non gazogènes, du genre *Endosporus*.

3. — Litière de feuilles de chêne, quelques feuilles de bouleau et de charme. Feuilles partiellement décomposées, accumulées sur plusieurs couches, sol acide du Bois de Boulogne (L3).

W3 L3.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	Très nombreuses	?	Nombreux	Innombrables
10^{-4}	Nombreuses	0	17	Très nombreuses
10^{-5}	25	0	4	Nombreuses
10^{-6}	3	0	0	115
10^{-7}	0	0	0	16
N. A.	2 750 000	?	285 000	137 500 000
Rapports	1 : 50	—	1 : 482	

Vr L3.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale				Gazogène
10^{-1}	P	P	P	P	+	+	+	+	
10^{-2}	—	—	—	—	+	+	+	+	
10^{-3}	—	—	—	P	+	+	+	+	
10^{-4}	(+)	—	—	—	+	+	+	+	
10^{-5}	—	—	—	—	+	+	—	—	
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—	
N. A.	100				120 000				
Rapport	1 : 1 200								

Malgré l'acidité du sol, nous obtenons des résultats voisins du n° 2, bien que dans l'ensemble nous ayons une microflore légèrement plus riche. Les nombreux aérobies pectinolytiques appartiennent à *E. pecti-*

novorum. Les espèces de Champignons sont variées. Les rapports microflore totale : pectinolytiques sont identiques. Le nombre des anaérobies est un peu plus grand, sans doute à cause de l'épaisseur de la litière. *Cl. polymyxa* se trouve toujours en très petit nombre et il n'y a pas d'Actinomycètes dans cet échantillon.

4. — Litière de feuilles de *Phragmites communis*, feuilles très décomposées, réduites en toutes petites parcelles, sous 10 cm d'eau (étang de l'Institut Pasteur de Garches). Le prélèvement est une sorte de boue végétale de pH 7,7, contenant 94,4 % d'eau (L4) :

Carbone organique	17,49 g % de matière sèche
Azote organique	1,93 g % de matière sèche
C/N	9,05
Humus	0,14 g % de matière sèche

W3 L4.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	Nombreuses	?	20	Très nombreuses
10 ⁻⁴	30	0	3	Nombreuses
10 ⁻⁵	4	0	0,5	122
10 ⁻⁶	0	0	0	15
N. A.	350 000	?	25 000	13 600 000
Rapports	1 : 38	—	1 : 544	

Vr L4.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	7 000				500 000			
Rapport	1 : 71							

Les Bactéries pectinolytiques aérobies tiennent encore une forte place dans cet échantillon. *Empedobacter pectinovorum* et *E. aquatile* constituent la totalité de ces germes. Les Champignons sont toujours actifs et les Actinomycètes peu ou pas représentés. Notons que les rapports microorganismes totaux sur microorganismes pectinolytiques n'ont guère changé.

Comme il fallait s'y attendre les Bactéries anaérobies tiennent ici une plus grande place.

Les pectinolytiques anaérobies ne sont pas des *Cl. polymyxa*. Nous verrons plus tard que ce germe cède sa place à des pectinolytiques anaérobies stricts lorsqu'il s'agit de prélèvements effectués sous l'eau.

5. — Cet échantillon est très proche de l'échantillon n° 4. C'est une boue à base de feuilles de *Phragmites communis* prélevée sous 5 cm d'eau dans l'étang des Trivaux (Seine-et-Oise) de pH 6,8 (L5).

W3 L5.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	10	2	0	Nombreuses
10 ⁻⁴	3	1	0,5	161
10 ⁻⁵	0,5	0	0	23
10 ⁻⁶	0	0	0	2
N. A.	20 000	6 000	?	2 150 000
Rapports	1 : 107	1 : 358	—	

Vr L5.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	—	+	+	+	+
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	2 300				50 000			
Rapport	1 : 21							

Nous sommes en présence d'un échantillon beaucoup moins riche en microorganismes mais les *Empedobacter* pectinolytiques sont toujours présents et en nombre relativement important. L'espèce dominante est *E. pectinovorum*. Parmi les godets à Bactéries orange, nous avons isolé une colonie présentant un jaune différent. Ce bâtonnet, muni d'un ou deux cils polaires, appartient à *Xanthomonas vascularum*. Les Actinomycètes sont également présents ici, mais les Champignons semblent absents.

Parmi les pectinolytiques anaérobies nous n'avons pas non plus isolé de *Cl. polymyxa*.

6. — *Terreau* : Terreau de feuilles et de fumier de cheval. Le terreau est préparé en entassant alternativement des couches de feuilles de chêne et de fumier de cheval. Il parvient à maturité la 3^e année. Couleur : brun noir, pH 7,6 (L6) :

Carbone organique	10,71 g % de matière sèche
Azote organique	1,84 g % de matière sèche
C/N	5,85
Humus	2,04 g % de matière sèche
Eau	53,9 %

W3 L6.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	Nombreuses	Nombreux	Envahissement	Envahissement
10 ⁻⁴	10	20	Envahissement	Très nombreuses
10 ⁻⁵	1	3	11	300
10 ⁻⁶	0,5	0	1	56
10 ⁻⁷	0	0	0	9
N. A.	100 000	250 000	1 050 000	73 000 000
Rapports	1 : 730	1 : 292	1 : 69	

C'est un substrat riche, avec tous les groupes pectinolytiques. Les Champignons dominent. Viennent ensuite les Actinomycètes puis les Bactéries aérobies pectinolytiques suffisamment abondantes pour qu'on puisse les dénombrer et les déterminer : *Bacillus subtilis* et *Empedobacter radicum* s'y trouvent en quantité à peu près égale. Nous remarquons l'absence d'*E. pectinovorum*. Les anaérobies sont abondants tant parmi les pectinolytiques que parmi les non-pectinolytiques.

Vr L6.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	P	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	P	P	—	+	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁷	—	—	—	—	+	—	—	—
N. A.	230 000				7 000 000			
Rapport	1 : 30							

Cl. polymyxa semble très actif puisqu'il est présent surtout dans les dernières dilutions. Dans les premières, il est masqué par d'autres micro-organismes non pectinolytiques qui coagulent la pectine.

III. — *Terres.*

Nous avons vu à maintes reprises combien peu nombreux étaient les travaux sur la fonction pectinolytique du sol.

Les travaux précurseurs de Duggeli (35) et Stöckli (158), puis ceux de Wieringa (180) portant l'attention sur le nombre important d'Actinomycètes pectinolytiques, enfin la découverte de *Flavobacterium pectinovorum* par Dorey (31) sont les seuls connus.

Pour regrouper et compléter les résultats épars de ces quelques travaux, nous reportons ici l'analyse d'échantillons de terres et de boues de diverses régions de France.

Les échantillons ont presque tous été prélevés dans l'horizon A1 (entre 3 et 10 cm de profondeur).

A. — *Terres de jardin et de culture maraîchère.*

1) Terre prélevée dans une plate-bande de l'Institut Pasteur. Plantations très diverses. Arrosage artificiel régulier. Terre calcaire, légère, caillouteuse, moyennement sableuse, gris brun, pH 8,1 (A1).

Carbone organique	4,71 g % de terre sèche
Azote organique	0,62 g % de terre sèche
C/N	7,6
Humus	1,02 g de terre sèche
Eau	28,1 %

W3 A1.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	30	Nombreux	25	Très nombreuses
10^{-4}	5	25	4	Nombreuses
10^{-5}	1	2	1	110
10^{-6}	0	0	0	10
10^{-7}	0	0	0	3
N. A.	40 000	225 000	32 500	20 000 000
Rapports	1 : 500	1 : 88	1 : 615	

Vr A1.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	P	P	P	+	+	+	+
10^{-4}	P	P	P	P	+	+	+	+
10^{-5}	—	—	—	—	+	+	+	+
10^{-6}	—	—	—	—	+	+	+	+
10^{-7}	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	50 000				5 000 000			
Rapport	1 : 100							

Cette terre contient tous les groupes pectinolytiques en bonne quantité. Parmi les Bactéries aérobies, la plupart des godets appartiennent à *B. subtilis*. Nous y trouvons quelques *Empedobacter* et plus spécialement *E. pectinovorum*. Le reste des germes pectinolytiques les plus couramment isolés se classent parmi les sporulés soient : *Bacillus pumilus* et *Endosporus circulans*.

Les anaérobies sont représentés presque essentiellement par *Cl. poly-myxa*, mais nous avons isolé un *Clostridium anaérobie* strict : *Cl. laniganii* qui ne se trouve qu'en petit nombre dans cette terre. C'est aussi le cas pour *Cl. eruptens* dont nous possédons la souche.

Les Actinomycètes pectinolytiques sont nombreux ; les Champignons pectinolytiques d'espèces très variées sont moyennement actifs.

2. — Terre calcaire prélevée dans un jardin de Seine-et-Oise, ressemblant beaucoup au prélèvement 1), légère, caillouteuse, gris brun (A₂).

pH	7,4
Carbone organique	5,43 g % de terre sèche
Azote organique	0,59 g % de terre sèche
C/N	9,1
Humus	1,59 g % de terre sèche
Eau	22,9 %

W3 A₂.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	Nombreuses	Nombreux	10	Très nombreuses
10 ⁻⁴	13	12	1	Nombreuses
10 ⁻⁵	2	2	0,5	102
10 ⁻⁶	0,5	0,5	0	24
10 ⁻⁷	0	0	0	4
N. A.	165 000	160 000	10 000	32 000 000
Rapports	1 : 193	1 : 200	1 : 3 200	

Vr A₂.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻³	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻⁴	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻⁵	P	P	P	—	+	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁷	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	230 000				5 000 000			
Rapport	1 : 21							

Comme dans l'échantillon précédent, *B. subtilis* constitue presque la totalité des Bactéries aérobies pectinolytiques. Les autres sporulés aérobies sont à nouveau *Endosporus circulans*. Parmi le genre *Empe-*

dobacter, nous signalerons *E. pectinovorum* et *E. aquatile*, ainsi que des variétés de ces deux espèces. Un *Pseudomonas* a été isolé, il s'agit de *P. schuyllkilliensis*. Les anaérobies pectinolytiques sont fort nombreux. *Cl. polymyza* domine, cependant, nous avons trouvé une souche de *Cl. laniganii*.

Dans une autre analyse de cette même terre, un tube à pectinolyse positive montrait une pigmentation verte du milieu. La culture était constituée par des *Plectridium*. Nous n'avons pas réussi à purifier ce germe à culture lente, mais il s'agit probablement de *Pl. virens*.

Les Actinomycètes sont toujours bien représentés, par contre, les Champignons diminuent en nombre.

3. — Terre formée sur les alluvions de la Seine, prélevée près de Poissy (Seine-et-Oise). Culture variée de primeurs. Gris brun foncé, très sableuse, peu calcaire (A3).

pH	6,6
Carbone organique	1,99 g % de terre sèche
Azote organique	0,23 g % de terre sèche
C/N	8,7
Humus	0,11 g % de terre sèche
Eau	15,6 %

Malgré la grande différence chimique avec les deux échantillons précédents, nous retrouvons qualitativement et quantitativement les mêmes éléments de la pectinolyse. Les sporulés sont les aérobies pectinolytiques dominants. Toutefois, *B. subtilis* est rare et c'est *E. circulans* qui constitue la presque totalité de ce groupe. Parmi les aérobies non sporulés, nous avons isolé quelques colonies d'*Empedobacter pectinovorum* ainsi qu'une souche d'*E. aquatile*.

W3 A3.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	Nombreuses	Nombreux	32	Très nombreuses
10 ⁻⁴	15	50	5	Nombreuses
10 ⁻⁵	1	7	0,5	200
10 ⁻⁶	0	0	0	34
10 ⁻⁷	0	0	0	5
N. A.	125 000	600 000	41 000	42 000 000
Rapports	1 : 336	1 : 70	1 : 1 024	

Vr A3.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻²	P + + +	+ + + +
10 ⁻³	P + + +	+ + + +
10 ⁻⁴	P P P P	+ + + +
10 ⁻⁵	P P P —	+ + + +
10 ⁻⁶	P — — —	+ + — —
10 ⁻⁷	— — — —	+ — — —
N. A.	330 000	1 900 000
Rapport	1 : 5,7	

Les anaérobies pectinolytiques avec *Cl. polymyxa* s'y rencontrent en grand nombre. Ils forment une part de la microflore totale anaérobie beaucoup plus importante que dans les deux échantillons précédents.

Le nombre des Actinomycètes pectinolytiques est grand. Les Champignons pectinolytiques sont moyennement actifs.

4. — Terre de culture variée, renfermant un fort pourcentage de calcaire actif par enfouissement de grandes quantités de coquilles calcaires marines, très alcaline, d'un gris clair, légère, prélevée dans la baie de Cherruix (Ille-et-Vilaine) (A4).

pH	9
Carbone organique	0,9 g % de terre sèche
Azote organique	0,19 g % de terre sèche
C/N	4,6
Humus	0,14 g % de terre sèche
Eau	13 %

W3 A4.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	26	Nombreux	5	Nombreuses
10 ⁻⁴	4	26	0	200
10 ⁻⁵	0	6	0	35
10 ⁻⁶	0	0	0	8
N. A.	33 000	430 000	5 000	5 750 000
Rapports	1 : 173	1 : 13	1 : 1 150	

Vr A4.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻²	P P + +	+ + + +
10 ⁻³	P P P P	+ + + +
10 ⁻⁴	P P — —	+ + + +
10 ⁻⁵	P — — —	+ — — —
10 ⁻⁶	— — — —	— — — —
N. A.	19 000	70 000
Rapport	1 : 3,6	

Les conditions physicochimiques sont ici nettement défavorables aussi la plupart des groupes pectinolytiques et la microflore totale sont-ils numériquement en régression. Au point de vue qualitatif, on ne trouve aucun *Empedobacter* mais surtout des sporulés et plus spécialement *B. subtilis*.

Parmi les anaérobies, bien qu'en plus faible quantité, nous avons toujours *Cl. polymyxa* : il constitue un quart de la microflore totale anaérobie.

Dans ce sol, les Actinomycètes pectinolytiques sont aussi nombreux que dans les terres précédentes. Ils bénéficient sans doute de l'alcalinité, alors que les Champignons régressent nettement à cause du pH élevé.

B. — Sols bruns, calcaires et rendzines.

1. — Terre brune, calcaire, prélevée sous une haie de *Symphoricarpos racemosus*, dans un jardin de Seine-et-Oise (B1).

pH	6,8
Carbone organique	2,82 g % de terre sèche
Azote organique	0,34 g % de terre sèche
C/N	8,3
Humus	0,41 g % de terre sèche
Eau	24 %

Les Bactéries pectinolytiques tant aérobies qu'anaérobies sont peu nombreuses malgré une microflore totale aussi importante que dans les terres de jardin. Les *Empedobacter* et parmi eux *E. aquatilis* constituent la majeure partie des godets.

W3 Br.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	15	Nombreux	12	Très nombreuses
10 ⁻⁴	3	60	3	Nombreuses
10 ⁻⁵	0	7	0,5	134
10 ⁻⁶	0	1	0	18
10 ⁻⁷	0	0	0	3
N. A.	22 500	650 000	21 000	24 000 000
Rapports	1 : 1 066	1 : 37	1 : 1 142	

Vr Br.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	P	P	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	P	P	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	—	+	—	—	—
10 ⁻⁷	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	5 000				700 000			
Rapport	1 : 140							

Cl. polymyxa est toujours dominant dans les cultures sur milieu Vr.

Les Actinomycètes pectinolytiques tiennent numériquement la première place.

2. — Terre brun ocre, caillouteuse, récoltée sur une butte calcaire de Seine-et-Oise, dans un bois peuplé densément de jeunes arbres : chênes, charmes, frênes, troènes, etc. (B2).

pH	7,4
Carbone organique	3,27 g % de terre sèche
Azote organique	0,27 g % de terre sèche
C/N	12,1
Humus	0,30 g % de terre sèche
Eau	20 %

W3 B₂.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	5	Nombreux	o	Très nombreuses
10 ⁻⁴	1,5	90	o	Nombreuses
10 ⁻⁵	o	17	o	260
10 ⁻⁶	o	4	o	31
10 ⁻⁷	o	0,5	o	5,5
N. A.	10 000	2 850 000	Moins de 1 000	43 000 000
Rapports	1 : 4 300	1 : 15	—	

Vr B₂.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻³	P	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	P	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	—	+	—	—	—
N. A.	1 100				700 000			
Rapport	1 : 636							

Nous obtenons la même image que dans la terre précédente mais plus accentuée : peu de Bactéries pectinolytiques aérobies et anaérobies (*Cl. polymyxa*), une grande quantité d'Actinomycètes, enfin très peu de Champignons. Les Bactéries aérobies sont à nouveau des *Empedobacter* que malheureusement nous n'avons pu isoler, il s'agit probablement d'*E. pectinovorum* ou d'*E. aquatilis*.

3. — Terre brun gris, caillouteuse, prélevée sous herbe sur une butte calcaire de Seine-et-Oise (B3).

pH	7,6
Carbone organique	6,42 g % de terre sèche
Azote organique	0,80 g % de terre sèche
C/N	8,0
Humus	0,58 g % de terre sèche
Eau	25 %

W3 B3.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	?	Nombreuses	o	Très nombreuses
10^{-4}	8	70	o	Nombreuses
10^{-5}	1,5	13	o	240
10^{-6}	o	3	o	36
10^{-7}	o	o	o	6
N. A.	115 000	2 150 000	Moins de 1 000	53 000 000
Rapports	1 : 460	1 : 24	—	

Vr B3.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10^{-2}	P	P	P	P	+	+	+	+
10^{-3}	P	P	—	—	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	—	—	+	+	+	+
10^{-5}	—	—	—	—	+	+	+	+
10^{-6}	—	—	—	—	+	—	—	—
N. A.	2 600				700 000			
Rapport	1 : 269							

Les Bactéries pectinolytiques aérobies sont en plus grand nombre dans ce prélèvement. Celui-ci, plus riche en matières organiques que le précédent, est prélevé dans la rhizosphère éloignée (édaphosphère).

Nous avons isolé un *Empedobacter* avec un pigment vert-jaune : *E. viride* n. sp. On remarque toujours de très nombreux Actinomycètes. Peu de Champignons et quelques *Cl. polymyxa*.

4. — Terre brun noir, prélevée sur une butte calcaire de Seine-et-Oise, dans un sous-bois, densément planté de jeunes arbres : chênes, aubépines, cornouillers sanguins, érables, etc., moyennement caillouteuse (B4).

pH	8,2
Carbone organique	9,00 g % de terre sèche
Azote organique	0,99 g % de terre sèche
C/N	9,1
Humus	2,08 g % de terre sèche
Eau	27 %

W3 B4.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	?	Nombreux	23	Très nombreuses
10 ⁻⁴	11	110	4	Nombreuses
10 ⁻⁵	2	21	1	300
10 ⁻⁶	0	1	1	36
10 ⁻⁷	0	0	0	6
N. A.	155 000	1 550 000	31 500	48 000 000
Rapports	1 : 309	1 : 31	1 : 1 492	—

Vr B4.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻³	P	P	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	+	+	—
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	1 200				230 000			
Rapport	1 : 191							

E. pectinovorum est le pectinolytique dominant dans ce prélèvement riche en matières organiques et avec un rapport C/N favorable. Malgré un pH plus alcalin, les Champignons ont augmenté en nombre par rapport aux terres précédentes. Sans cela, la même image se présente : dominance des Actinomycètes et peu de *Cl. polymyxa*.

5. — Terre brun ocre, granuleuse, prélevée dans un pâturage-type du Jura, à 1 300 m. Flore habituelle des prairies jurassiennes (B5).

pH	6,7
Carbone organique	5,22 g % de terre sèche
Azote organique	0,89 g % de terre sèche
C/N	5,8
Humus	0,41 g % de terre sèche
Eau	38,4 %

W3 B5.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	?	Nombreux	Nombreux	Très nombreuses
10^{-4}	o	50	9	Nombreuses
10^{-5}	o	8	o	131
10^{-6}	o	1,5	o	16
10^{-7}	o	o	o	3
N. A.	Moins de 10 000	650 000	90 000	23 000 000
Rapports	—	1 : 35	1 : 255	

Vr B5.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10^{-2}	+ — — —	+ + + +
10^{-3}	— — — —	+ + + +
10^{-4}	— — — —	+ + + +
10^{-5}	— — — —	+ + + +
10^{-6}	— — — —	+ + + —
10^{-7}	— — — —	+ — — —
N. A.	60	3 300 000
Rapport	1 : 55 000	

Malgré une microflore aérobie et anaérobie assez riche, la très faible quantité de Bactéries pectinolytiques aérobies est frappante dans cette rendzine. Comme dans tous les sols calcaires, les Actinomycètes sont toujours nombreux. Nous n'avons pu isoler aucune souche de Bactéries pectinolytiques dans cet échantillon.

6. — Terre brun noir, granuleuse, légère, récoltée dans une forêt de sapins du Jura à 1 500 m. La couche A₀ de 5-10 cm d'épaisseur est constituée par des aiguilles de sapins à moitié décomposées. Vient ensuite la couche A₁ de terre granuleuse, très riche en matières orga-

niques. Roche-mère calcaire, mais la réaction du prélèvement (A1) est nulle à l'acide chlorhydrique (B6).

pH	7,7
Carbone organique	11,46 g % de terre sèche
Azote organique	1,47 g % de terre sèche
C/N	7,8
Humus	2,04 g % de terre sèche
Eau	43,4 %

W3 B6.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	?	30	5	Très nombreuses
10 ⁻⁴	0	2	1	Nombreuses
10 ⁻⁵	0	0,5	0	71
10 ⁻⁶	0	0	0	5
N. A.	Moins de 10 000	25 000	7 500	6 050 000
Rapports	—	1 : 242	1 : 806	

Vr B6.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻²	— — — —	+ + + +
10 ⁻³	— — — —	+ + + +
10 ⁻⁴	— — — —	+ + + +
10 ⁻⁵	— — — —	+ + + +
10 ⁻⁶	— — — —	+ + — —
10 ⁻⁷	— — — —	+ + — —
N. A.	Moins de 50	1 900 000
Rapport	—	

Nous avons encore un bilan négatif en ce qui concerne les Bactéries pectinolytiques. Actinomycètes et Champignons paraissent les seuls groupes actifs. La microflore totale, moyenne pour les aérobies, est assez riche pour les anaérobies.

C. — *Terres de grandes cultures*

(appartenant au groupe des sols bruns lessivés ou peu lessivés).

Ces terres sont brun ocre, lourdes, compactes et pauvres en matières organiques. Elles ont été gagnées sur d'anciens sols podzolisés de forêts ou de landes.

1. — Terre brun ocre, prélevée dans 3 champs de cultures variées (luzerne, pommes de terre, blé), près de Villacoublay (Seine-et-Oise) (C1).

pH	7,3
Carbone organique	0,91 g % de terre sèche
Azote organique	0,23 g % de terre sèche
C/N	4,0
Humus	0,18 g % de terre sèche
Eau	14 %

W3 C1.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	?	Nombreux	10	Très nombreuses
10 ⁻⁴	3	25	2	Nombreuses
10 ⁻⁵	0,5	6	0,5	83
10 ⁻⁶	0	1	0	14
10 ⁻⁷	0	0	0	2
N. A.	30 000	425 000	15 000	17 000 000
Rapports	1 : 566	1 : 40	1 : 1 133	

Vr C1.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	—	+	+	+	—
10 ⁻⁷	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	7 000				2 300 000			
Rapport	1 : 328							

Nous avons isolé à plusieurs reprises un *Pseudomonas* de cet échantillon. Il s'agit de *P. schuykilliensis*. Aucun godet ne possède de colonies pigmentées : donc absence des *Empedobacter*. *Cl. polymyxa* se trouve en nombre moyen dans cette terre. Les Actinomycètes forment la majorité des godets de liquéfaction. Quelques Champignons viennent compléter le tableau de la pectinolyse.

2. — Terre brun clair, prélevée dans un champ de cultures variées (blé, pommes de terre), près de Longuesse (Seine-et-Oise). Le terrain repose sur roche-mère crayeuse. La terre est calcaire et moins compacte que les autres échantillons du groupe C (C₂).

pH	7,8
Carbone organique	0,91 g % de terre sèche
Azote organique	0,16 g % de terre sèche
C/N	5,7
Humus	0,07 g % de terre sèche
Eau	14 %

W3 C₂.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	?	Nombreux	4	Très nombreuses
10 ⁻⁴	0	50	0	Nombreuses
10 ⁻⁵	0	13	0	180
10 ⁻⁶	0	2	0	27
10 ⁻⁷	0	0	0	3,5
N. A.	Moins de 10 000	1 650 000	4 000	31 000 000
Rapports	Env. 1 : 3 100	1 : 19	1 : 7 750	

Vr C₂.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻⁴	P	P	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	—	+	—	—	—
10 ⁻⁷	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	12 000				700 000			
Rapport	1 : 58							

Les *Actinomycètes* et *Cl. polymyxa* sont les agents principaux de la pectinolyse. Peu de Bactéries pectinolytiques aérobies et de Champignons.

3. — Terre brun ocre, lourde, compacte, prélevée dans des champs avec cultures alternantes (betteraves, blé, sarrasin, pommes de terre, etc.), commune de La Bouëxière (Ille-et-Vilaine). Roche-mère : grès siliceux primaire (C3).

pH	7,4
Carbone organique	1,0 g % de terre sèche
Azote organique	0,19 g % de terre sèche
C/N	5,2
Humus	0,22 g % de terre sèche
Eau	19 %

W3 C3.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	?	Nombreux	4	Très nombreuses
10 ⁻⁴	2	25	0,5	Nombreuses
10 ⁻⁵	0	3	0	44
10 ⁻⁶	0	0,5	0	6
N. A.	20 000	275 000	4 000	5 200 000
Rapports	1 : 260	1 : 19	1 : 1 300	

Vr C3.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻²	P P P P	+ + + +
10 ⁻³	P P P P	+ + + +
10 ⁻⁴	P P — —	+ + + +
10 ⁻⁵	— — — —	+ + + +
10 ⁻⁶	— — — —	— — — —
N. A.	18 000	500 000
Rapport	1 : 28	

Bacillus subtilis et *Cl. polymyxa* sont les Bactéries pectinolytiques dominantes. Le rapport Actinomycètes : microflore totale est toujours bas et identique au prélèvement précédent.

4. — Terre de grande culture, de couleur brun gris, compacte, lourde, argileuse. Cultures variées (blé, betteraves, pommes de terre, etc.). Roche-mère : grès siliceux, prélevée dans la commune de Servon (Ille-et-Vilaine) (C4).

pH	5,7
Carbone organique	1,5 g % de terre sèche
Azote organique	0,22 g % de terre sèche
C/N	6,8
Humus	0,67 g % de terre sèche
Eau	20 %

W3 C4.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	?	Nombreux	5	Nombreuses
10 ⁻⁴	1	35	0,5	180
10 ⁻⁵	0	3	0	19
10 ⁻⁶	0	0	0	2
N. A.	10 000	325 000	5 000	1 950 000
Rapports	1 : 195	1 : 6	1 : 390	

Vr C4.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻³	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻⁴	P	P	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	P	—	—	—	+	+	+	—
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	19 000				230 000			
Rapport	1 : 12							

Malgré une microflore totale faible et un pH bas, on trouve normalement les groupes pectinolytiques. *Cl. polymyxa* et les Actinomycètes se rencontrent encore en même nombre.

5. — Terre brun ocre, lourde, prélevée dans la rhizosphère éloignée d'un terrain de pâture (Graminées, trèfles, plantain et Composées). Commune de La Bouëxière (Ille-et-Vilaine). Roche-mère : alluvions quaternaires, sablé-argile (C5).

pH	5,8
Carbone organique	3,9 g % de terre sèche
Azote organique	0,55 g % de terre sèche
C/N	5,1
Humus	0,45 g % de terre sèche
Eau	36 %

W3 C5.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	?	Nombreux	5	Très nombreuses
10^{-4}	4	30	0,5	Nombreuses
10^{-5}	0,5	2	0	39
10^{-6}	0,5	0	0	5,5
N. A.	40 000	250 000	5 000	4 700 000
Rapports	1 : 117	1 : 19	1 : 940	

Vr C5.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10^{-2}	P	P	P	P	+	+	+	+
10^{-3}	P	P	P	P	+	+	+	+
10^{-4}	P	—	—	—	+	+	+	+
10^{-5}	—	—	—	—	+	+	+	+
10^{-6}	—	—	—	—	+	+	—	—
10^{-7}	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	7 000				1 200 000			
Rapport	1 : 171							

La proximité de la rhizosphère n'entraîne pas ici un accroissement marqué de la microflore totale et des microorganismes pectinolytiques. Dans les dernières dilutions (10^{-5} , 10^{-6}), nous avons isolé une Bactérie sporulée : *Terminosporus sphæricus* qui n'a été découverte que dans cette terre. Ceci excepté, nous sommes à nouveau en présence du tandem Actinomycètes-*Cl. polymyxa*.

6. — Terre brune, boueuse, lourde, compacte, prélevée dans une prairie marécageuse (pâturage). L'herbe de pâture est mélangée à une forte proportion de *Juncus effusus*. Sur le sol, quelques touffes de *Sphagnum* (commune de La Bouëxière, Ille-et-Vilaine) (C6).

pH	5,5
Carbone organique	3,9 g % de terre sèche
Azote organique	0,66 g % de terre sèche
C/N	5,9
Humus	1,57 g % de terre sèche
Eau	60 %

W3 C6.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	3	0	1,5	Nombreuses
10^{-4}	1	0	0	73
10^{-5}	0	0	0	10
10^{-6}	0	0	0	1
N. A.	6 500	Moins de 1 000	1 500	1 000 000
Rapports	1 : 154	—	1 : 667	

Vr C6.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	P	P	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	P	—	+	+	+	+
10^{-5}	—	—	—	—	+	+	+	—
10^{-6}	—	—	—	—	+	—	—	—
N. A.	23 000				330 000			
Rapport	1 : 14							

L'anaérobiose permanente et sans doute aussi l'action de la rhizosphère de *Juncus effusus* sont les causes probables du changement intervenu par rapport aux terres précédentes. Les Actinomycètes ont pratiquement disparu. Comme Bactéries aérobies pectinolytiques, nous retrouvons les *Empedobacter* : *E. radicum* n. sp. et non plus *E. pectinovorum-aquatile*. *B. subtilis* s'isole en quantité à peu près égale avec cet *Empedobacter*.

Cl. polymyxa n'est plus l'anaérobie pectinolytique dominant car *Cl. laniganii* a pu être isolé dans les dernières dilutions à pectinolyse positive.

D. — *Terres acides.*

Ces terres ont été prélevées dans l'horizon A₁ de sols nettement podzolisés.

1. — Nous groupons ici 3 échantillons de terres prélevées dans les bois de Meudon. Les facteurs physicochimiques, la végétation et les résultats de l'analyse bactériologique sont analogues (D₁).

Terre brun gris, légère, sableuse, avec débris végétaux. Flore : chênes, châtaigniers, ormes.

pH	4,2	
Carbone organique	3,66	g % de terre sèche
Azote organique	0,322	g % de terre sèche
C/N	11,4	
Humus	0,46	g % de terre sèche
Eau	34	%

W3 D₁.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	13	6	28	Nombreuses
10 ⁻⁴	2	1	4	90
10 ⁻⁵	0	0,5	0,5	12
10 ⁻⁶	0	0	0	1,5
N. A.	16 500	8 000	34 000	1 350 000
Rapports	1 : 82	1 : 169	1 : 39	

Vr D1.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻¹	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻²	P	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻³	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	—	—	—
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	70				70 000			
Rapport	1 : 1 000							

Comme il fallait s'y attendre, l'acidité du sol provoque un accroissement notable du nombre de Champignons pectinolytiques, ainsi qu'une diminution de la microflore totale. Mais les Bactéries pectinolytiques aérobies s'y trouvent en bon nombre ; dans la majorité des godets bactériens un sporulé : *E. circulans* est isolé. Les Actinomycètes n'appartiennent pas au genre habituel (*Streptomyces*), mais au genre *Nocardia*.

Cl. polymyxa n'est que très faiblement représenté donc inactif.

2. — Mor forestier prélevé dans un bois de sapins (commune de La Bouëxière, Ille-et-Vilaine). Terre fine, légère, essentiellement organique d'un brun très foncé avec un peu de sable fin. Roche-mère : grès siliceux (D2).

pH	3,4
Carbone organique	16,5 g % de terre sèche
Azote organique	1,44 g % de terre sèche
C/N	11,5
Humus	4,5 g % de terre sèche
Eau	44,7 %

La très forte acidité, la grande quantité de matières organiques impliquent une pauvreté en microorganismes et la prédominance des Champignons. Ceux-ci sont donc actifs. Peu important est le nombre des Bactéries pectinolytiques, toutes sporulées. Parmi les aérobies, nous trouvons : *Endosporus humi* et dans les anaérobies *Cl. polymyxa*. Les Actinomycètes sont totalement absents.

W3 D₂.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale	
				Champignons non pectinolytiques	Bactéries non pectinolytiques
10 ⁻²	?	?	Nombreux	Nombreuses	Nombreuses
10 ⁻³	1	0	30	80	80
10 ⁻⁴	0	0	4	22	10
10 ⁻⁵	0	0	0	7	4
N. A.	1 000	Moins de 1 000	35 000	460 000	250 000
Rapports	1 : 250 1 : 460	—	1 : 13 1 : 7		
	= 1 : 710		= 1 : 20		

Vr D₂.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻¹	P	P	P	+	+	+	+	+
10 ⁻²	P	+	—	—	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	—	—
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	260				12 000			
Rapport	1 : 46							

3. — Terre de bruyère. Terre brun foncé, avec sable fin, riche en matières organiques et entrecoupée de nombreuses racines et radicelles. Flore dominante : bruyères (3 sortes) et *Molinia caerulea*. Roche-mère : grès siliceux. Prélèvement sur une lande de la commune de Servon (Ille-et-Vilaine) (D3).

pH	3,8	
Carbone organique	5,2	g % de terre sèche
Azote organique	0,725	g % de terre sèche
C/N	7,8	
Humus	3,37	g % de terre sèche
Eau	63	%

W3 D3.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale	
				Champignons non pectinolytiques	Bactéries non pectinolytiques
10 ⁻³	?	?	Nombreux	Nombreuses	Nombreuses
10 ⁻⁴	0	0	9	8	20
10 ⁻⁵	0	0	3	1	2
10 ⁻⁶	0	0	0	0	0
N. A.	Moins de 10 000	Moins de 10 000	195 000	90 000	200 000
Rapports	—	—	1 : 0,5		
			1 : 1,0		
			= 1 : 1,5		

Vr D3.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻¹	P	P	P	—	+	+	+	+
10 ⁻²	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻³	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	—	—	—
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	22				7 000			
Rapport	1 : 318							

Cet échantillon est à l'image du précédent ; nous nous trouvons dans des conditions physicochimiques similaires : grand nombre de Champignons et de Champignons pectinolytiques ; pauvreté de la microflore totale et des Bactéries pectinolytiques. Quelques tubes présentent une pectinolyse positive à *Cl. polymyxa* ; mais cette dernière espèce est inactive, vu son petit nombre de germes. Le pH bas inhibe à nouveau les Actinomycètes.

4. — Terre brun gris, très sablonneuse, lourde, humide, avec de nombreuses radicelles. Elle est prélevée sur la même lande que le numéro 3

à un endroit plus humide, où la bruyère a fait place à quelques touffes de *Sphagnum* (D4).

pH	4,1	
Carbone organique	3,0	g. % de terre sèche
Azote organique	0,465	g % de terre sèche
C/N	6,5	
Humus	1,35	g % de terre sèche
Eau	35	%

W3 D4.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale	
				Champignons non pectinolytiques	Bactéries non pectinolytiques
10 ⁻²	3	?	Nombreux	En quantité moyenne	En quantité moyenne
10 ⁻³	0	0,5	14	5	50
10 ⁻⁴	0	0	3	2	5
10 ⁻⁵	0	0	1	1	2,5
N. A.	300	500	22 000	12 500	50 000
Rapports	1 : 208	1 : 125	1 : 0,5 1 : 2 = 1 : 2,5		

Vr D4:

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻¹	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻²	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻³	P	P	P	P	+	+	+	+
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	—	—	—
N. A.	5 000				70 000			
Rapport	1 : 14							

Parmi les microorganismes pectinolytiques, les Champignons dominent toujours. Le nombre des Bactéries aérobies pectinolytiques et des Actinomycètes est encore très bas. Nous n'avons pu isoler les Bactéries aérobies pectinolytiques, qui ne sont pas des *Empedobacter*. La compacité ainsi que l'humidité de cette terre semblent favoriser *Cl. polymyxa* bien représenté pour un sol aussi pauvre en microorganismes.

5. — Terre voisine de la précédente (4), brun gris, lourde, argileuse, humide, prélevée dans un bois de pins sylvestres plus ou moins marécageux. Le sous-bois est densément planté de Graminées (commune de Servon, Ille-et-Vilaine). Sous-sol. Sable argileux (D5).

pH	4,6
Carbone organique	2,8 g % de terre sèche
Azote organique	0,25 g % de terre sèche
C/N	10,5
Humus	1,23 g % de terre sèche
Eau	30 %

Cette terre semble mieux équilibrée. Les Bactéries s'y trouvent en plus grand nombre et les Champignons ont beaucoup diminué. Comme Bactéries pectinolytiques aérobies, nous avons isolé *B. subtilis* et, en quantité à peu près égale, un bâtonnet asporulé et immobile, Gram — : *Acinetobacter butyri*.

W3 D5.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale	
				Champignons non pectinolytiques	Bactéries
10 ⁻²	?	?	?	Nombreuses	Nombreuses
10 ⁻³	2	0	2	7	150
10 ⁻⁴	0,5	0	0	1	20
10 ⁻⁵	0,5	0	0	1	4
N. A.	2 000	Moins de 1 000	2 000	7 000	300 000
Rapports	1 : 153	—	1 : 153	—	—

Vr D5.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻¹	P P P P	+ + + +
10 ⁻²	P P P P	+ + + +
10 ⁻³	P P P P	+ + + +
10 ⁻⁴	+ — — —	+ + + +
10 ⁻⁵	— — — —	+ + — —
N. A.	7 000	120 000
Rapport	1 : 17	

Cl. polymyxa est bien ici encore la Bactérie pectinolytique dominante, car il trouve dans ce terrain argileux les conditions vitales nécessaires.

6. — Terre brun noir, riche en matières organiques, humide, prélevée dans un bois marécageux avec horizon à gley, près de l'étang des Tri-vaux (Seine-et-Oise, commune de Meudon) (D6).

Flore : aulnes, quelques bouleaux ; sous-bois : *Carex* ; sous-sol : sable argileux.

pH	6,2
Carbone organique	9,78 g % de terre sèche
Azote organique	1,5 g % de terre sèche
C/N	6,5
Humus	2,45 g % de terre sèche
Eau	68,3 %

W3 D6.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Actinomycètes	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	20	10	10	Très nombreuses
10 ⁻⁴	5	3	2	Nombreuses
10 ⁻⁵	1	0	0,5	40
10 ⁻⁶	0	0	0	3
N. A.	35 000	20 000	15 000	3 500 000
Rapports	1 : 100	1 : 175	1 : 233	—

Vr D6.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10^{-2}	+	+	P	P	+	+	+	+
10^{-3}	P	P	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	—	—	+	+	+	+
10^{-5}	—	—	—	—	+	+	—	—
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	12 000				120 000			
Rapport	1 : 10							

Un pH voisin de la neutralité, la richesse en matières organiques et la grande humidité sont les facteurs qui permettent à *Empedobacter aquatilis* de bien se développer, au sein de cet échantillon. Cette Bactérie est responsable de tous les godets bactériens. Nous retrouvons également les Actinomycètes moyennement actifs.

Deux Bactéries pectinolytiques anaérobies : *Cl. polymyxa* et *Plectridium pectinovorum* digèrent la pectine en anaérobiose.

Quelques Champignons viennent compléter le tableau des microorganismes pectinolytiques.

7. — Terre très humide, de couleur brun rouille à brun rougeâtre, très organique, avec une forte proportion de débris de *Phragmites communis* partiellement digérés. Prélevée dans une phragmitaie à l'étang de Dampierre (Seine-et-Oise) (D7).

pH	4,8
Carbone organique	16,95 g % de terre sèche
Azote organique	2,07 g % de terre sèche
C/N	8,2
Humus	4,89 g % de terre sèche
Eau	84 %

Dans cette formation tourbeuse, les *Empedobacter* se multiplient peu au sein d'une microflore relativement riche. Nous n'avons plus les bâtonnets minces et effilés du groupe *pectinovorum-aquatilis*, mais des bâtonnets plus courts et plus larges appartenant à l'espèce *Empedobacter arundineti* n. sp.

Les anaérobies pectinolytiques, en nombre moyen, se répartissent comme dans l'échantillon précédent, sur les deux espèces *Cl. polymyxa* et *Plectridium pectinovorum*. Celui-ci paraît être, cette fois, l'élément dominant.

W3 D7.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	3	0	7	Nombreuses
10 ⁻⁴	1	0	2	240
10 ⁻⁵	0	0	0,5	30
10 ⁻⁶	0	0	0	6
N. A.	3 000	Moins de 1 000	7 000	4 500 000
Rapports	1 : 1 500	—	1 : 643	

Vr D7.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques				Microflore totale			
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	P	P	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	P	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	—	—	—	+	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	—	+	+	—	—
N. A.	19 000				1 200 000			
Rapport	1 : 63							

E. — *Boues et eaux.*

Ces substrats de rH bas conviennent tout particulièrement aux Bactéries anaérobies. Ce sont les Bactéries qui ont été isolées les premières comme agents de la pectinolyse car elles ont toutes leur importance dans le rouissage. Pendant longtemps, elles furent les seuls micro-organismes pectinolytiques connus. Selon les données bibliographiques, on peut penser qu'elles se trouvent en petite quantité aussi bien sur les plantes textiles elles-mêmes (sans doute à l'état sporulé) que dans les boues des rivières qui servent au rouissage. Mais, c'est seulement lorsque les plantes sont entreposées dans l'eau que ces germes vont se multiplier d'une manière intensive.

Depuis l'isolement du premier anaérobie pectinolytique par Friber (45) la liste des espèces n'a cessé de croître ; presque toutes ont un rôle dans la destruction de la pectine des différentes plantes textiles immergées.

Mais il est certain aussi qu'elles sont les agents principaux dans la macération de n'importe quelles plantes aquatiques.

Les aérobies pectinolytiques sont souvent présents mais moins actifs dans le processus du rouissage. Allen (2) trouve *B. subtilis* dans les bacs de rouissage à côté de très nombreux anaérobies. Au cours du rouissage de *Malachra capitata*, Betrabet et Bhat (12) isolent 40 souches d'aérobies appartenant à divers *Pseudomonas* (pas de noms d'espèces) ; *A. aerogenes*, *A. cloacæ*, *E. freundii*, *A. brookeri*, *Flavobacterium aquatile* et quelques *Bacillus*.

Nous-mêmes avons déjà montré l'importance de certains aérobies du groupe *Empedobacter pectinovorum-aquatile* dans la macération des feuilles de *Phragmites communis* sous une petite couche d'eau (thèse, p. 77).

Nous reportons ci-dessous quelques analyses de boues de différentes provenances.

1. — Boue de l'étang de Villebon (commune de Meudon, Seine-et-Oise). Gris noirâtre, à odeur de SH_2 , entremêlée de débris végétaux (E1).

pH	6,1
Carbone organique	4,5 g % de boue sèche
Azote organique	1,1 g % de boue sèche
C/N	4,1
Eau	86 %

Nous ne retrouvons pas, dans cette boue, les Bactéries pectinolytiques habituelles. Les *Empedobacter*, *B. subtilis* et *Cl. polymyxa* font défaut. Nous avons pu isoler quelques *Myxobactéries* du genre *Angiococcus*, mais ces germes à culture capricieuse n'ont pas vécu assez longtemps pour qu'on puisse déterminer leur espèce.

W3 E1.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	5	13	15	Très nombreuses Nombreuses 92 15
10^{-4}	1	2	2	
10^{-5}	0	0,5	0,5	
10^{-6}	0	0	0	
N. A.	7 500	16 500	17 500	15 000 000
Rapports	1 : 2 000	1 : 909	1 : 857	

Vr E1.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	—	+
10 ⁻⁵	—	+
10 ⁻⁶	—	—
N. A.	5 000	230 000
Rapport	1 : 46	

2. — Vase gris verdâtre, floconneuse, légère, prélevée dans l'étang de Chevré (commune de La Bouëxière, Ille-et-Vilaine) (E2).

Flore dominante : *Sparganium ramosum*, *Typha angustifolia*.

pH	6,3	
Carbone organique	3,9	g % de boue sèche
Azote organique	1,022	g % de boue sèche
C/N	3,8	
Eau	86	%

B. subtilis, des *Empedobacter* (du groupe *pectinovorum-aquatile*, non isolés) et quelques myxobactéries se partagent à égalité les godets. Ce sont les germes classiques de ces boues. Les Actinomycètes pectinolytiques abondent. Pour les anaérobies, nous pouvons affirmer l'absence de *Cl. polymyxa*, mais nous n'avons pu isoler d'autres germes.

W3 E2.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	7	52	4	Nombreuses
10 ⁻⁴	2	8	0,5	120
10 ⁻⁵	1	1	0,5	15
10 ⁻⁶	0	0,5	0	4
N. A.	13 500	66 000	4 500	2 750 000
Rapports	1 : 204	1 : 43	1 : 611	

Vr E2.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	+	+
10 ⁻⁵	—	+
10 ⁻⁶	—	—
10 ⁻⁷	—	+
N. A.	7 000	330 000
Rapport	1 : 47	

3. — Boue gris noirâtre, à odeur de SH₂, prélevée dans l'étang de Dampierre (Seine-et-Oise) (E3).

pH	7,2
Carbone organique	7,41 g % de boue sèche
Azote organique	1,19 g % de boue sèche
C/N	6,2
Humus	1,02 g % de boue sèche
Eau	85,6 %

Ce prélèvement est intéressant car c'est l'unique fois où nous avons pu isoler une *Erwinia*, ici *E. betivora*. Les autres germes pectinolytiques aérobies sont représentés par *B. subtilis* et quelques Actinomycètes. De grosses colonies de levures (L) creusent un très faible godet dans la couche de pectine. Sur le plan anaérobie, *Cl. polymyxa* n'a pas été trouvé, mais un anaérobie strict : *Cl. laniganii* le remplace.

W3 E3.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	2	4,5	10 (9 L)	190
10 ⁻⁴	0	0	1,5 (L)	34
10 ⁻⁵	0	0,5	0,5 (L)	5
10 ⁻⁶	0	0	0	1
N. A.	2 000	4 500	12 500	420 000
Rapports	1 : 210	1 : 93	1 : 33	

Vr E3.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	+	+
10 ⁻⁵	—	+
10 ⁻⁶	—	—
N. A.	7 000	500 000
Rapport	1 : 71	

4. — Boue grisâtre, assez lourde, argileuse, prélevée dans un ruisseau à courant lent, près de Sagny (Seine-et-Oise). Odeur putride, ammoniacale (E4).

pH	6,8	
Carbone organique	2,0	g % de boue sèche
Azote organique	0,16	g % de boue sèche
C/N	12,4	
Humus	0,065	g % de boue sèche
Eau	52	%

A partir des godets orange, nous avons purifié *Empedobacter aquatilis*. Les godets à Bactéries non pigmentées, qui se trouvaient en quantité égale avec *E. aquatilis* sont formés par un sporulé *Endosporus multiplex*. Les Actinomycètes se trouvent en bon nombre dans cet échantillon. Les Champignons semblent totalement absents.

W3 E4.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	10	20	0	Très nombreuses
10 ⁻⁴	2,5	7	0	Nombreuses
10 ⁻⁵	0	1	0	180
10 ⁻⁶	0	0,5	0	23
10 ⁻⁷	0	0	0	4
N. A.	17 500	45 000	Moins de 1 000	31 500 000
Rapports	1 : 1 800	1 : 700	—	

Vr E4.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10^{-2}	+ + + +	+ + + +
10^{-3}	+ + — —	+ + + +
10^{-4}	— — — —	+ + + +
10^{-5}	— — — —	+ + + +
10^{-6}	— — — —	+ — — —
N. A.	1 200	700 000
Rapport	1 : 583	

Bien que cette boue se rapproche des terres argileuses et lourdes étudiées plus haut (C), c'est un anaérobie strict : *Plectridium pectinovorum* qui assure la pectinolyse en anaérobiose.

5. — Boue fine, légère, gris blanc, calcaire, formée par la décomposition des galets calcaires du lac de Joux (Jura : 1 000 m). Prélevée au bord du lac, végétation presque nulle : quelques algues formant une couche mince sur les galets (E5).

pH	7,7	
Carbone organique	2,22	g % de boue sèche
Azote organique	0,41	g % de boue sèche
C/N	5,4	
Humus	0,061	g % de boue sèche
Eau	77	%

W3 E5.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	1	0	0,5	En quant. moyen.
10^{-4}	0	0	0	24
10^{-5}	0	0	0	3
10^{-6}	0	0	0	1
N. A.	1 000	Moins de 1 000	500	270 000
Rapports	1 : 270	—	1 : 540	

Vr E5.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10^{-2}	+	+
10^{-3}	+	+
10^{-4}	—	+
10^{-5}	—	+
N. A.	700	70 000
Rapport	1 : 100	

Les sporulés sont pratiquement les seuls germes pectinolytiques rencontrés. Du côté des aérobies, nous avons *Bacillus subtilis* ; pour les anaérobies c'est *Cl. laniganii* qui est actif. Ces germes ne se trouvent qu'en fort petit nombre dans cette boue, pauvre aussi en microorganismes totaux.

6. — Boue constituée d'algues unicellulaires et de sable fin jaune gris, recueillie par centrifugation d'une eau sulfureuse de Dax. Elle a été conservée un mois en glacière avant l'analyse. Les caractères physicochimiques n'ont pu être précisés vu la trop petite quantité (1 g) récoltée (E6.)

Les Bactéries aérobies se sont multipliées fortement. Les colonies sont si nombreuses qu'il est impossible de reconnaître les godets ou de dénombrer les pectinolytiques aérobies.

W3 E6.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-4}	?	?	?	Innombrables
10^{-5}	?	?	?	Très nombreuses
10^{-6}	?	?	?	Nombreuses
10^{-7}	0,5	0	0	250
N. A.	—	—	—	?
Rapports	—	—	—	

Vr E6.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques			Microflore totale			(3 tubes par dilution)
10 ⁻²	P	P	+	+	+	+	
10 ⁻³	+	P	+	+	+	+	
10 ⁻⁴	—	—	—	+	+	+	
10 ⁻⁵	—	—	—	+	+	+	
10 ⁻⁶	—	—	—	+	+	+	
10 ⁻⁷	—	—	—	—	—	—	
N. A.	5 000			5 000 000			
Rapport	1 : 1 000						

Donc, l'intérêt de cette boue se situe parmi les pectinolytiques anaérobies. *Cl. felsineum*, qui se trouvait en nombre égal avec *Cl. polymyxa*, a pu être isolé. Les tubes à *Cl. felsineum* prennent une couleur caractéristique jaune vert canari, puis s'assombrissent lentement pour devenir rouge brique.

CONCLUSIONS

Comme dans l'ensemble de la microbiologie, les résultats obtenus dépendent beaucoup de la technique employée et surtout du milieu de culture. Pour toutes les analyses aérobies, nous nous sommes servi de milieux en boîtes donnant quantitativement des chiffres très inférieurs à ceux obtenus en milieux liquides. C'est pourquoi tous nos chiffres, au cours de l'étude de ces terres, n'ont rien d'absolu mais permettent seulement de comparer les terres entre elles. Il en est de même, quoique de façon moindre pour le milieu W3t ou Vr, car tous les gels semblent inhiber plus ou moins la croissance des microorganismes si on compare celle-ci à la croissance en milieu liquide.

Le choix du milieu influence non seulement la quantité de germes décelés mais aussi leur qualité. Ainsi pourraient s'expliquer bien des contradictions touchant les recherches des divers auteurs : Duggeli (35) qui emploie des milieux liquides en tubes, à base de fragments de pomme de terre trouve *Clostridium polymyxa* comme pectinolytique essentiel des terres qu'il étudie. Il ne mentionne pas la présence de Champignons pectinolytiques dans des sols acides de forêts. Les Bactéries microaérophiles, en effet, se développent très rapidement dans ces tubes

remplis de milieux liquides, ne laissant pas aux Champignons le temps de pousser. Lambina (82) obtient les mêmes résultats avec des milieux liquides à base de pomme de terre et de levure : *Clostridium polymyxa* est le germe dominant des sols de prairies. Pour Dorey (31), il en est tout autrement parce qu'il travaille avec le milieu sur plaques de Wieringa : dans 31 sols d'Angleterre, il n'isole aucun *polymyxa* mais des Champignons, Actinomycètes et d'autres Bactéries. Cela provient de deux faits : *Cl. polymyxa* se cultive mal sur le milieu de Wieringa avec de l'azote inorganique et ce germe dépasse rarement les dilutions 10^{-4} dans les sols courants. Or, dans ces dilutions, le nombre de colonies est en général si élevé, qu'on ne peut distinguer les tout petits godets formés par ce germe. Le même raisonnement peut s'appliquer aux germes phytopathogènes du sol, les *Erwinia* par exemple. Ils sont si peu nombreux que l'on ne les voit pas dans les dilutions 10^{-1} à 10^{-3} . Il faut le milieu sélectif de Kerr (74) pour les déceler.

On ne peut donc apprécier la totalité de la microflore pectinolytique d'une terre qu'en employant des milieux sélectifs différents : les milieux sur plaques ou en larges tubes, gélifiés par de la pectine avec azote minéral, permettent la reconnaissance des Champignons, des Actinomycètes et des Bactéries aérobies pectinolytiques ; les milieux en tubes plus étroits, riches en azote organique, sélectionnent les microorganismes anaérobies stricts et les microaérophiles tels que *Cl. polymyxa*.

L'étude de ces 40 échantillons de terre et boues permet de préciser l'écologie des divers microorganismes pectinolytiques du sol. Les Bactéries aérobies isolées se situent dans plusieurs ordres de la classification, mais certains noms d'espèces et de genres reviennent plus souvent localisant ainsi la pectinolyse du sol chez quelques familles seulement.

La famille des *Pseudomonadaceæ* groupe pratiquement à elle seule, toutes les espèces asporulées. Deux genres y sont surtout actifs : *Pseudomonas* et *Empedobacter*. Les *Erwinia*, les *Achromobacter* et les *Acinetobacter* n'apparaissent que sporadiquement au cours de cette étude. En effet, le genre *Erwinia* avec *E. betivora* n'a été isolé qu'une seule fois dans une boue noire à SH_2 (E3).

Divers auteurs pensaient pourtant que ce genre était principalement responsable de la pectinolyse du sol. Nous voyons qu'il n'en est rien et que cette hypothèse repose sur le fait que ces germes sont fréquemment isolés en phytopathologie. Nous pensons donc qu'ils ne se multiplient que très peu dans le sol et n'exercent leur activité qu'au contact des plantes blessées et vivantes. Leur pouvoir pectinolytique est donc important dans l'attaque bien particulière des différents bulbes, racines, rhizomes et autres parties des plantes. *E. carotovora*, par exemple, peut s'attaquer à une foule de plantes : chou, céleri, pomme de terre, tomate, concombre, etc., de même *E. betivora*, *E. atroseptica*, *E. aroideæ* et

bien d'autres (voir Bergey's *Manuel*, 7^e édition). Ce sont ces Bactéries qui mènent l'attaque de front, pénétrant dans la plante par les lenticelles et les petites blessures. Ceci permet à d'autres microorganismes d'envahir à leur tour les tissus déjà décomposés par les premiers. Pour les isoler, précise Kerr (74), il faut prélever des tissus se trouvant dans la zone qui sépare les cellules encore saines des cellules attaquées.

Aucune espèce des genres *Achromobacter*-*Acinetobacter* n'a été trouvée au cours de cette étude. Ils ne sont pas inexistants puisqu'ils apparaissent sporadiquement dans la rhizosphère ainsi que dans les boues du Ruwenzori, mais leur nombre est trop restreint pour qu'on puisse les isoler par cette technique : leur activité est nulle dans les terres habituelles.

Les conclusions sont bien différentes pour les genres *Empedobacter* et *Pseudomonas*, car les quelques espèces actives apparaissent souvent et dans des substrats bien déterminés.

Dans le genre *Empedobacter*, deux groupes se distinguent aisément : le premier comprend des Bactéries en forme de bâtonnets minces et allongés, souvent filamenteux. *E. pectinovorum* et l'espèce très voisine *E. aquatile* sont les espèces types de ce groupe. Le deuxième qui comprend l'espèce nouvelle *E. radicum* et *E. arundineti* s'oppose avec des bâtonnets courts et épais.

Le groupe *E. pectinovorum*-*E. aquatile* est particulièrement actif dans les substrats riches en humus ou en matières organiques végétales suffisamment décomposées. Une forte humidité de même qu'une mince couche d'eau semblent le favoriser. Un pH neutre ou voisin de la neutralité est nécessaire. Les feuilles non décomposées n'en contiennent presque pas alors que les analyses en révèlent 1,3 et 2,7 millions par gramme dans les litières très dégradées. Ces germes sont ici et dans les boues végétales à base de *Phragmites communis* (350 000 et 20 000), les seules Bactéries aérobies actives. La boue noirâtre de l'étang des Trivaux (D6) en comprend en moyenne 35 000 par gramme de terre.

Nous retrouvons ces germes en nombre moyen, mais mélangés avec d'autres pectinolytiques dans les terres de jardins ou de cultures (A1, A2, A3) de pH neutre, riches en humus et parmi les sols calcaires bien équilibrés riches aussi en humus (B1, B4). Les sols jurassiques B5 et B6 font exception, car les *Empedobacter* sont absents. Pourtant leurs caractéristiques physicochimiques sont conformes à celles énoncées plus haut. Nous pensons donc que l'absence de ces germes est due surtout à une différence qualitative de l'humus ou des tissus végétaux en décomposition (abondance du sapin, rareté des arbres à feuilles caduques).

E. pectinovorum et *aquatile* n'ont pu être décelés dans les terres de grandes cultures et les sols acides. Le manque d'humus dans le premier

groupe, l'acidité dans le deuxième sont visiblement les deux facteurs inhibant l'activité de ces germes.

Quant aux boues, nous constatons que ces Bactéries sont absentes dans les boues noirâtres à odeur de SH_2 , mais très actives (voir plus haut) dans les boues végétales neutres et bien aérées.

Le deuxième groupe d'*Empedobacter* avec *E. radicum* et l'espèce voisine *E. arundineti* est beaucoup moins répandu ; il apparaît sporadiquement : dans le terreau (n° 6), dans un sol boueux, acide (C6) ainsi que dans une tourbière jeune, acide, à base de feuilles de roseaux. Dans les deux derniers cas, les germes se présentent en petit nombre, sans doute à cause de l'acidité du sol. Les deux espèces ne cohabitent pas avec le premier groupe d'*Empedobacter*, mais semblent aussi avoir comme lieu de prédilection les substrats à forte humidité bien humifiés et riches en tissus végétaux décomposés.

Le genre *Pseudomonas* dont l'espèce principale est *Ps. schuylkilliensis* s'oppose au genre *Empedobacter* du fait que nous l'avons isolé à plusieurs reprises (voir également rhizosphère) dans des sols de grandes cultures, neutres et peu humifiés (terres à blé).

Les sporulés aérobies, avec le genre *Bacillus*, s'adaptent contrairement aux asporulés à toutes sortes de sols et de substrats. *Bacillus subtilis* l'espèce dominante se rencontre mélangée à d'autres dans de nombreuses terres et boues, exception faite des substrats trop acides. Nous l'avons trouvé en grande quantité dans le terreau n° 6, mais non dans les litières végétales. Il est également très actif dans les terres de jardins bien humifiées et sablonneuses (A1, A4). Le pH élevé de A4 (9) lui permet encore une bonne croissance. Il est fréquent dans les boues mais en petite quantité. Nous l'avons même isolé de la boue noire à SH_2 (E3), à côté d'*Erwinia betivora*, ainsi que dans la vase très pauvre du lac de Joux (E5). Cependant, *B. subtilis* semble peu actif dans les sols bruns, calcaires (B), les terres de grandes cultures (C) et les sols acides (D) où on ne le trouve que sporadiquement en faible quantité.

Endosporus circulans et le groupe des sporulés aérobies facultatifs non gazogènes, plus rarement isolés, suivent un peu la même loi que *B. subtilis*. Ils sont abondants dans les terres riches de jardins et semblent actifs dans une terre acide du bois de Meudon (D1).

Ce groupe nous conduit au germe pectinolytique le plus répandu : *Clostridium polymyxa*, anaérobie facultatif et gazogène. La technique des tubes scellés le révèle même là où il ne dépasse pas les dilutions 10^{-1} ou 10^{-2} ; ainsi avons-nous une idée très exacte de sa répartition. Bien que déterminé ou reconnu dans tous les échantillons, il est inactif dans certains vu le petit nombre de ces germes. C'est le cas pour les litières végétales (1, 2, 3), les sols très acides, mor forestier, terre de bruyère

par exemple (D1, 2, 3), avec une forte proportion de matière végétale non assimilée. Il semble défavorisé également dans les sols bruns calcaires et rendzines. Deux facteurs pourraient être la cause de cette inhibition : une trop grande teneur en matière végétale non assimilée et une aération trop intense de ces sols à textures granuleuses. Notons enfin, que dans toutes les boues et surtout les boues sous eau, il est remplacé par des anaérobies stricts. Là encore, plusieurs hypothèses sont valables : trop grande proportion en matière organique non assimilée ou un rH trop bas.

Cl. polymyxa peut être isolé facilement des terres de grandes cultures, lourdes et compactes, type C1 à C6, dans lesquelles, très souvent, c'est la seule Bactérie pectinolytique active. De même pour les sols acides dont l'humidité est plus élevée et la teneur en matière organique plus faible (D4, D5). Ce germe se trouve en grand nombre dans les terres de jardin A1-A4 et dans le terreau n° 6. Plus que nulle autre Bactérie étudiée, il supporte de grands écarts de pH puisqu'il est encore actif à pH 4 (D4) et à pH 9 (A4).

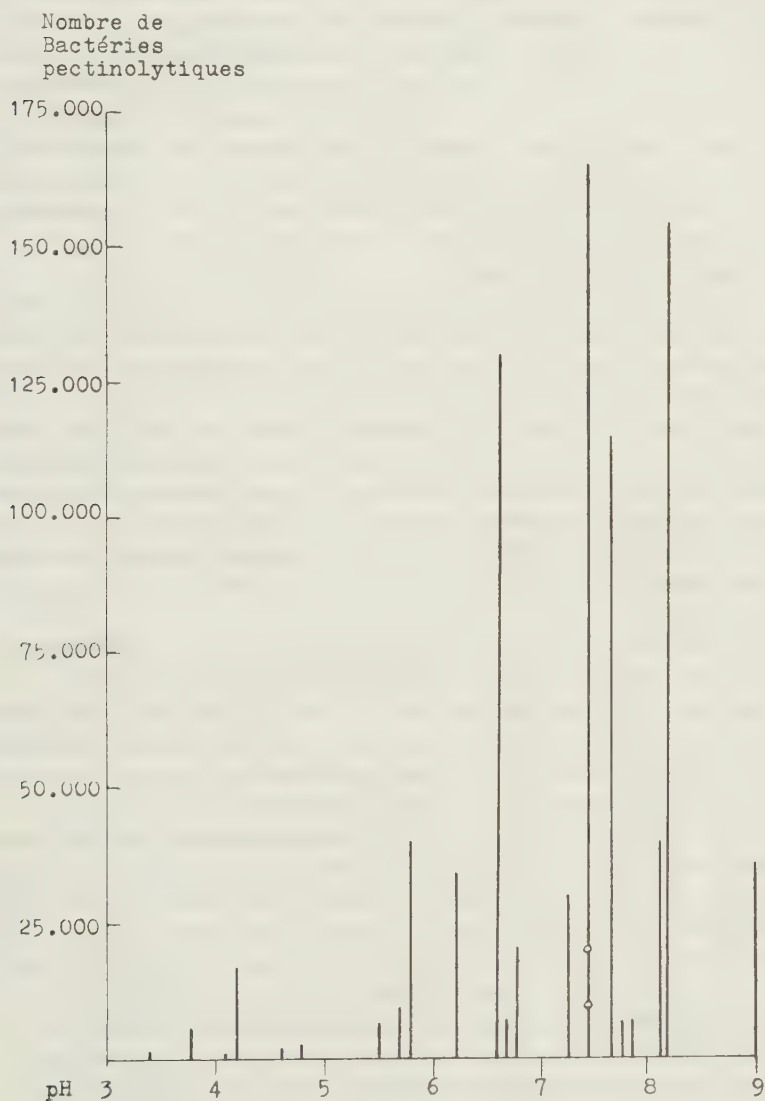
Les boues de toutes sortes (E1 à E5, C6 ; D6, D7 et les litières n° 4 et 5) constituent l'habitat préféré des anaérobies stricts. Ils y assurent la macération des litières végétales aquatiques.

Le rH bas de ces lieux permet une prolifération aisée aux différentes espèces. La plus répandue est certainement *Plectridium pectinovorum*. A ses côtés, nous trouvons souvent différents *Clostridium*, entre autres, *Cl. laniganii* et *Cl. eruptens*. Les espèces telles que *Cl. felsineum* et *Pl. virens* sont plus rares et ne s'isolent que sporadiquement. Nous n'avons malheureusement jamais rencontré *Cl. omnivorum*, *Cl. pectinolyticum* et *Cl. aurantibutyricum* ; ces germes ne se découvrent sans doute que sur des substrats bien déterminés. Quant aux anaérobies plus répandus cités plus haut, nous n'avons pas remarqué de préférence notoire pour certaines boues. Mises à part les terres riches de jardins où ils sont cependant peu nombreux, les anaérobies sont inactifs dans les litières végétales normales ou les autres groupes de terres. Dans ceux-ci, c'est *Cl. polymyxa* qui est isolé avec les tubes scellés sous vide alors que dans les boues ce germe laisse la place aux anaérobies stricts.

Plusieurs travaux antérieurs ainsi que cette étude montrent que les Bactéries pectinolytiques ne sont pas des microorganismes spécialisés dans la pectinolyse, mais bien des saprophytes banaux, polyphages, possédant en plus les enzymes pectinolytiques. Ils sont donc soumis aux grandes lois qui régissent les Bactéries du sol en général. En plus des préférences de chaque groupe de germes pour un substrat donné, nous devons tenir compte des facteurs importants tels que : pH, rH, teneur en carbone, en azote, C/N, etc.

On connaît depuis longtemps l'action du pH (par ex.) sur l'ensemble

des microorganismes du sol. Comme nous le verrons dans le graphique n° 1, les Bactéries pectinolytiques du sol ne dérogent pas à la loi



GRAPHIQUE N° 1. — Action du pH sur les Bactéries pectinolytiques du sol

générale. 23 des terres étudiées (A1-D7) sont reportées sur ce tableau. le pH de la terre étant sur l'abscisse et le nombre de Bactéries pectinolytiques correspondant sur l'ordonnée. Nous constatons que les Bactéries

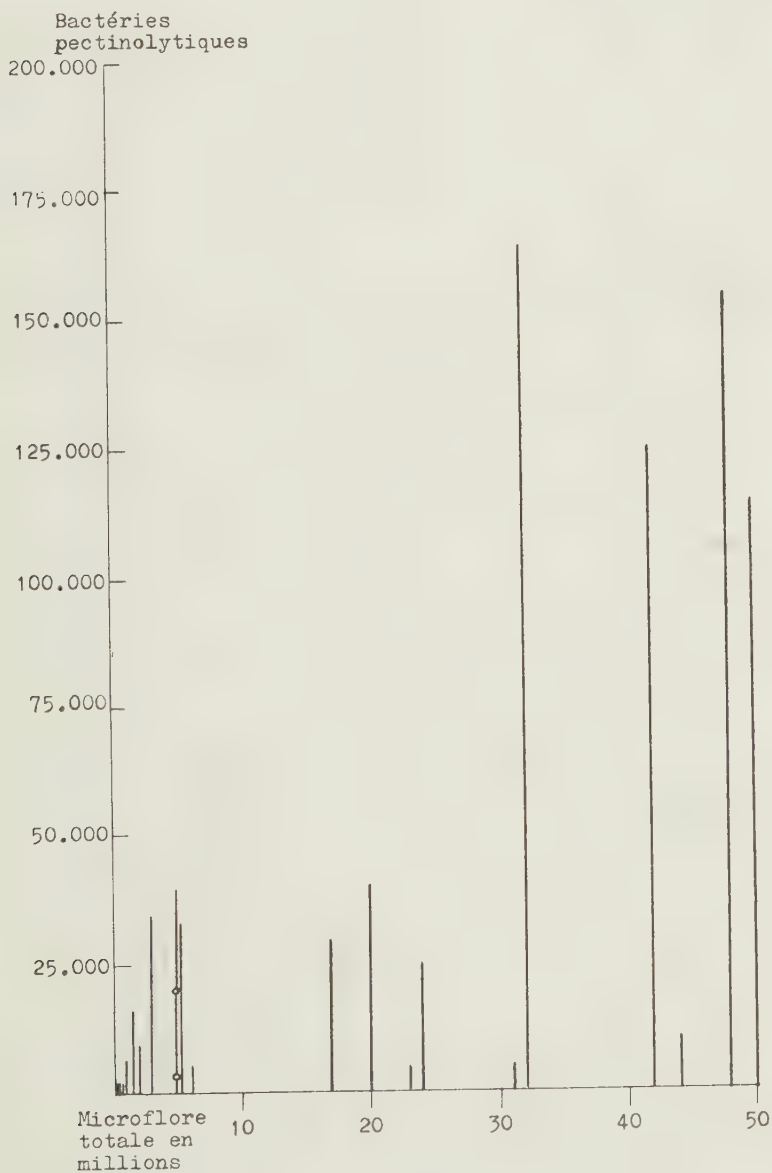
pectinolytiques sont évidemment peu nombreuses dans les substrats acides et qu'il faut chercher le maximum de pectinolytiques dans les sols à pH voisin de la neutralité (6,8-8,2). Ceci ne veut pas dire que tous les sols neutres contiennent beaucoup de pectinolytiques, car d'autres facteurs peuvent limiter le nombre de ces germes. Le graphique montre plusieurs terres de pH 6,5 à 8,2 ne contenant pas plus de Bactéries pectinolytiques que les sols acides. C'est donc l'ensemble des facteurs d'un sol, aussi bien physicochimiques que biologiques qui déterminera la quantité de Bactéries pectinolytiques. Ainsi nous trouvons un maximum de Bactéries pectinolytiques et de microorganismes divers parmi les terres de jardin, ces dernières étant à tous points de vue très équilibrées et réputées comme très fertiles.

De cette assertion, on pourrait déduire que le nombre de Bactéries pectinolytiques croît régulièrement avec le nombre de Bactéries totales non pectinolytiques. C'est en partie vraie : le graphique n° 2 nous montre que le plus grand nombre de pectinolytiques se trouve en général parmi les terres microbiologiquement très actives. Mais nous remarquons aussi des teneurs en pectinolytiques très faibles dans des terres riches en microorganismes. De même, si nous étudions les rapports pectinolytiques : microflore totale, nous verrons que ceux-ci sont fort divers : le plus faible étant de 1 Bactérie pectinolytique pour 31 Bactéries, le plus élevé de 1 Bactérie pectinolytique pour plus de 4 000 germes.

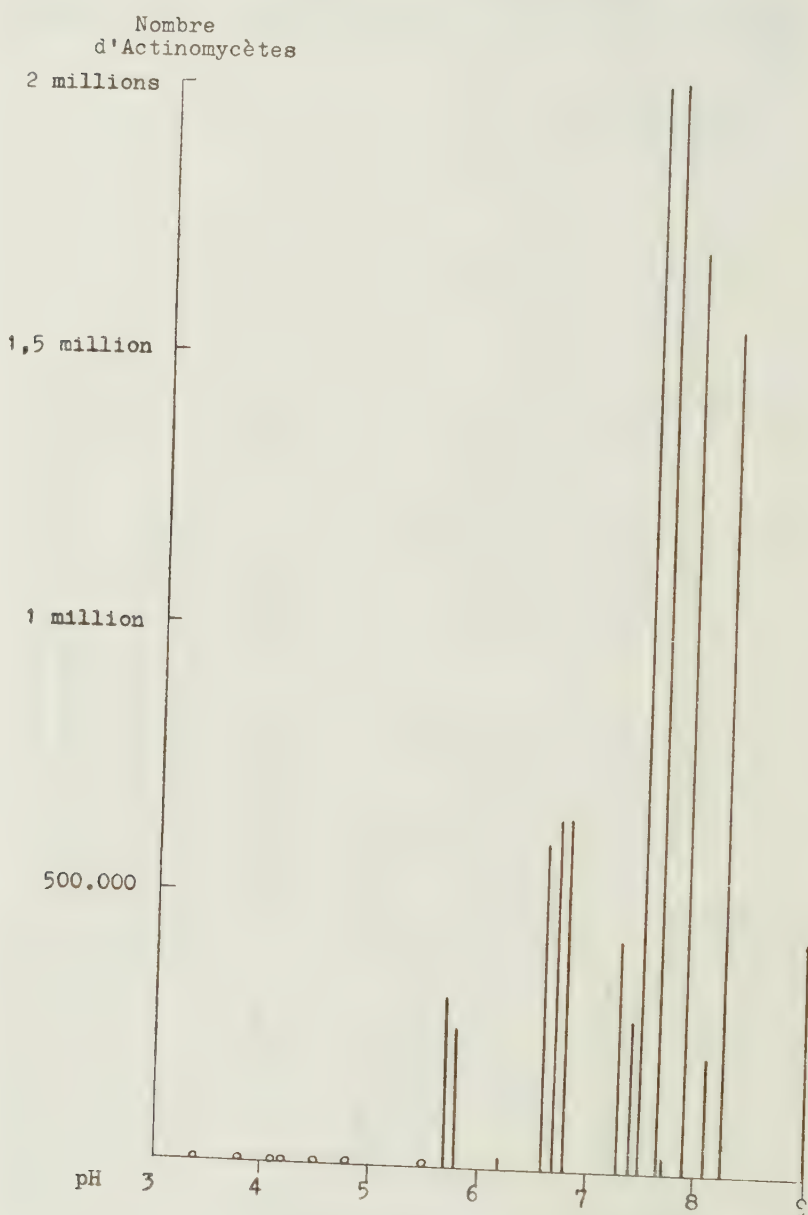
Ces résultats sont difficilement explicables car de très nombreux facteurs dont l'importance nous échappe interviennent au sein d'une terre. Cependant, beaucoup trouvent une solution du fait de la préférence de certains groupes de microorganismes pour des substrats bien définis : les *Empedobacter* en très grand nombre dans les litières de feuilles y donneront des rapports très bas (en moyenne 1 : 50).

Les Actinomycètes sont, de loin, les microorganismes pectinolytiques rencontrés le plus souvent sur les milieux W3. Dans maints sols, par exemple, les terres C de grandes cultures, ils constituent plus de 90 % des godets. Les Actinomycètes sont soumis, eux aussi, aux lois générales. En principe, ils sont abondants dans tous les sols de pH neutre et riches en CaCO_3 (B1-B4, C2). Au contraire, les sols neutres mais sans CaCO_3 (B6) et les terres acides leur sont néfastes. Le graphique n° 3 illustre plus clairement ces données déjà énoncées par Wieringa. Cet auteur en rencontre également beaucoup dans les litières qu'il étudie ; nous-même, n'en avons pas vu dans les litières de feuilles nos 1-3. Il faut croire que ces organismes ne sont actifs que dans les litières neutres de certains végétaux et qui reposent sur des sols calcaires. Les boues en contenant des quantités très moyennes, ils supportent donc un certain degré d'anaérobiose.

En général, ils appartiennent tous au genre *Streptomyces*. Dans deux terres très particulières (B6, D1), le genre *Nocardia* remplace les *Streptomyces*.



GRAPHIQUE N° 2. — Nombre de Bactéries pectinolytiques par rapport au nombre total des Bactéries.



GRAPHIQUE N° 3. — Action du pH sur les Actinomycètes pectinolytiques du sol.

Étant donné leur tolérance pour les pH acides, les Champignons et ici les Champignons pectinolytiques s'adaptent fort bien dans les mors forestiers et les terres de bruyères (D2, D3) ou tout sol acide. Dans ces cas, la pectinolyse s'effectue grâce à eux seuls, car nul autre micro-organisme pectinolytique ne peut s'y multiplier. Ils peuvent être encore très actifs dans les terres neutres ou même de pH légèrement alcalin. Ainsi les verrons-nous en très grand nombre à côté d'autres micro-organismes pectinolytiques, dans le terreau n° 6 (pH 7,6) ou dans les litières végétales (n°s 2, 3). Rappelons à ce sujet, qu'ils sont les premiers hôtes pectinolytiques des feuilles fraîchement tombées (Wieringa (181), et thèse p. 73).

En réunissant ces quelques exemples, nous voyons qu'indépendamment du pH (graphique n° 4) ces microorganismes se multiplient de préférence sur des substrats riches en matière organique végétale à divers stades de décomposition (graphique n° 5).

La qualité et le degré de décomposition des tissus végétaux leur importent peu, ils s'installent et exercent leur fonction pectinolytique sur des litières très riches en lignine (mor forestier, terre de bruyère, par ex.), là où les autres groupes pectinolytiques ne pourront se multiplier. Les Champignons préparent le terrain pour les autres pectinolytiques, ce sont des pionniers.

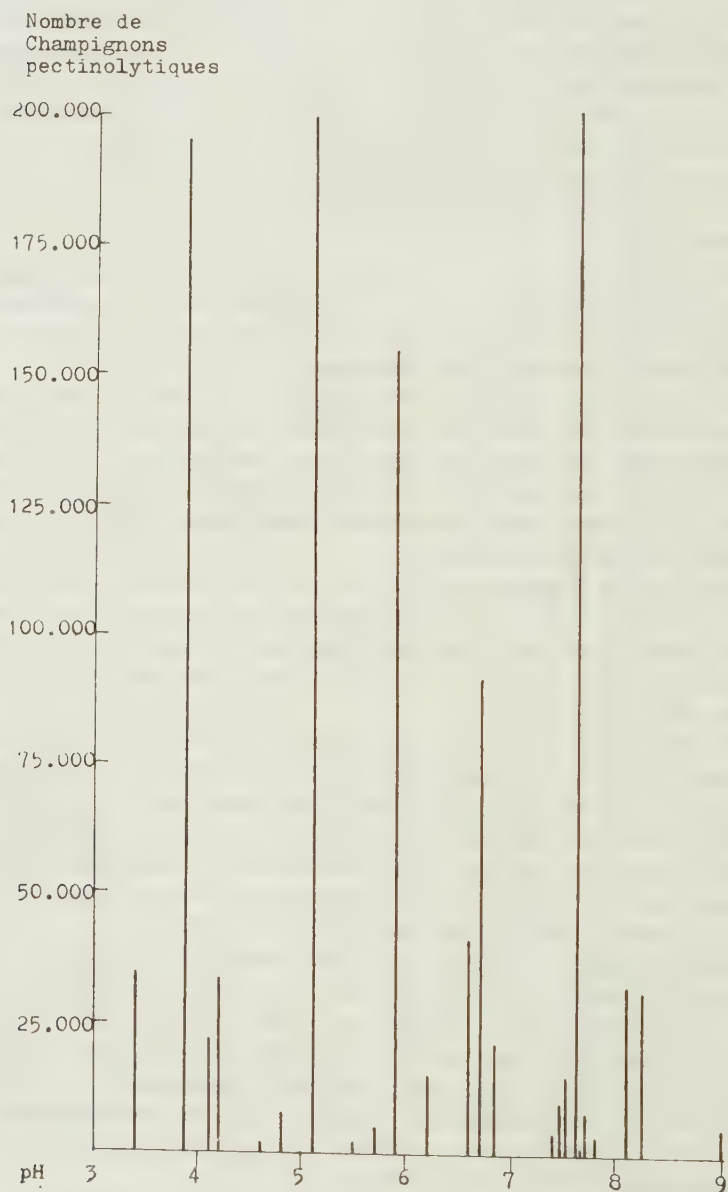
Cependant, le graphique n° 5 nous met en présence de sols riches en matière organique et contenant peu de Champignons. L'explication en est parfois le rH bas de certains échantillons boueux (D5, 6, 7). Pour d'autres cas, les facteurs d'inhibition nous échappent (sols calcaires B2, B3).

L'importance de la pectinolyse fongique au sein du sol est mise davantage encore en évidence par l'emploi du milieu W3t. Lors de la mise au point du milieu avec M.-A. Chalvignac, nous avons remarqué que pour 4 terres les Champignons provoquaient la pectinolyse dans les dernières dilutions. Ainsi en avons-nous trouvé 13 millions par gramme d'un terreau de feuilles caduques, 3 millions pour la terre de jardin A1, donc exactement 100 fois plus qu'avec le milieu W3.

Il est vrai que les 2 analyses ont été réalisées à des époques différentes de l'année. L'une avec le milieu W3t était faite au printemps, lors de très fortes pluies, l'autre avec milieu W3 était mise en route en été. Il faut dire aussi que le milieu W3t par l'absence d'extraits végétaux défavorise les Actinomycètes qui n'apparaissent que tardivement. Pour la terre de grande culture, ce sont les Actinomycètes qui provoquent la pectinolyse dans les dernières dilutions, mais seulement à partir du 16^e jour.

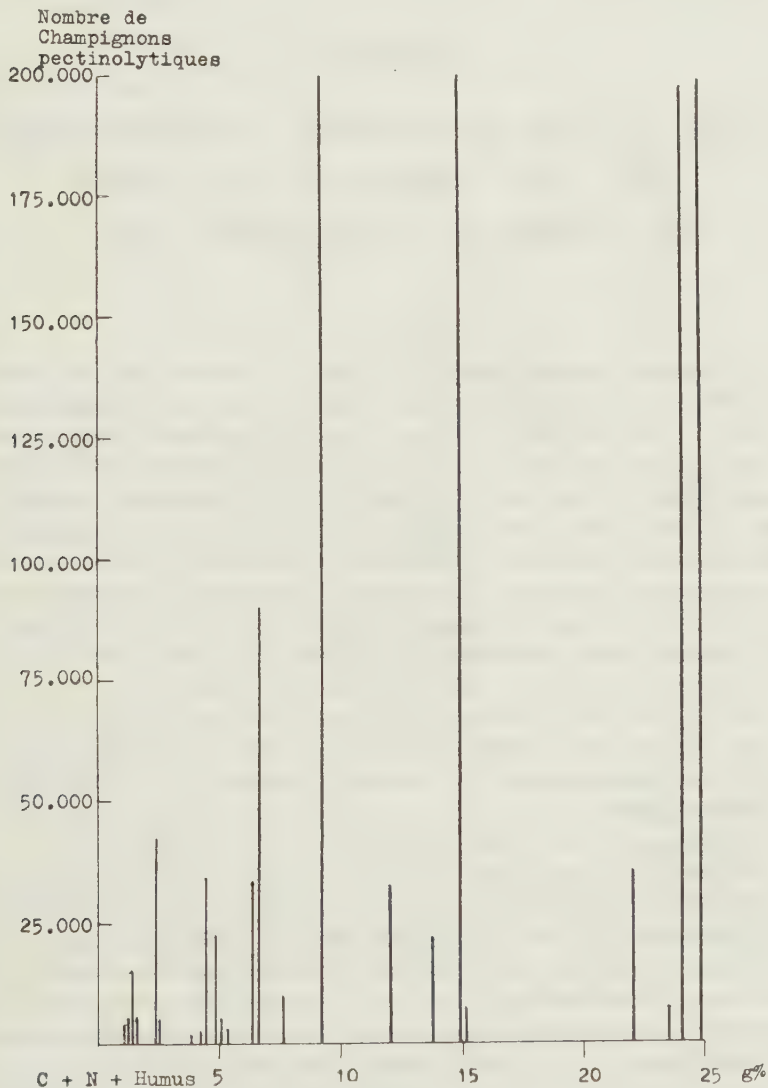
Néanmoins, pensons-nous, les Champignons tiennent dans le sol une

place prépondérante au point de vue pectinolyse : outre cette étude de 5 terres, le milieu W3t a servi à l'analyse de 15 terres, prélevées au



GRAPHIQUE N° 4. — Action du pH sur les Champignons pectinolytiques du sol.

cours de l'été 1960, pour les travaux pratiques du cours de microbiologie du sol. Là encore, dans la plupart des cas, les Champignons étaient responsables de la pectinolyse dans les dernières dilutions.



GRAPHIQUE N° 5. — Nombre de Champignons pectinolytiques en fonction du taux de matière organique du sol.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE LA MICROFLORE PECTINOLYTIQUE DANS LES SÉDIMENTS LACUSTRES DU MASSIF DU RUWENZORI (Congo)

Le Ruwenzori, massif volcanique, situé à l'intérieur du Parc National Albert, à l'Est du Congo, recèle de nombreux petits lacs situés entre 3 500 et 4 000 m. Ceux-ci reposent dans des cuvettes à fond rocheux ou argileux et sont alimentés par les glaciers ou les rivières qui en sont issues. Tous ont une eau froide, souvent gelée en surface pendant la nuit. La végétation aquatique proprement dite est inexistante. Les lacs situés près des glaciers ne sont entourés d'aucune végétation, alors que ceux qui sont au-dessous, plus grands, ont souvent des bords marécageux, colonisés par de nombreux *Carex*. Les forêts de bruyères et de sénéçons géants descendent parfois jusqu'aux abords immédiats des lacs qui récoltent ainsi le bois et les feuilles mortes.

Pour les lacs supérieurs, sans végétation, nous aurons donc des sédiments constitués uniquement d'argile gris verdâtre ; pour les lacs inférieurs, des boues argileuses ou sableuses, contenant des débris ligneux de divers végétaux.

C'est en 1956, lors d'une expédition dans ces contrées vierges, que H. Mollaret et S. de Heinzelin de Braucourt (102) dressèrent une première carte de ces lacs (p. 125). En même temps, ils ramenaient 40 échantillons environ de sédiments lacustres, prélevés aseptiquement. Ces boues conservées en glacière à 3° C n'ont malheureusement pu être analysées qu'une année après le prélèvement. Le nombre de microorganismes pectinolytiques par gramme de boue n'a donc rien d'absolu et peut figurer, tout au plus, comme ordre de grandeur.

Les échantillons ramenés en 1958, lors d'une deuxième expédition, ont été analysés immédiatement à leur arrivée, soit un mois après le prélèvement. Le nombre de microorganismes pectinolytiques a déjà plus de valeur et peut ainsi être comparé avec les sédiments des étangs français.

Mais le but premier de cette étude reste l'étude qualitative de la microflore pectinolytique ; d'autant plus, que ces régions étant inhabitées par l'homme, la microflore qui s'y trouve peut être considérée comme *originelle*, selon la notion d'A.-R. Prévot.



Carte schématique des hauts massifs du Ruwenzori ; éch. 1/100 000.

Abréviations des noms des lacs : Bj. : Bujuku; Bk. E. : Bukurungu oriental; Bk. W. : Bukurungu occidental; Bl. : Blanc; C. : Catherine; D. : Dominique; G. : Gris; I. : Irène; K. : Kitandara; L. : Lune; M. : Marion; N. : Noir; S. : Canard sauvage; V. : Vert.

Les techniques d'études employées sont celles décrites pour les terres françaises, avec en aérobiose le milieu W3 et en anaérobiose le milieu Vr.

Les prélèvements de 1956 ont été ensemencés à raison de 2 tubes par dilution, en milieu Vr : un des tubes est incubé à 26° C, l'autre à 37° C.

Pour les prélèvements de 1958, nous avons pris 4 tubes de Vr par dilution tous placés à 30° C. Tous les milieux W3 ont été portés à 26° C.

Lac Dominique.

Altitude : 3 820 m.

Température de l'air à 16 heures : + 6,6° C.

Température de l'eau à 10 cm sous la surface : 6,4° C.

pH de l'eau : 4,6.

Profondeur de 0 à 5 m, fond boueux. Le niveau d'eau du lac varie considérablement passant par des périodes d'assèchement total et des périodes de hautes eaux.

LAC DOMINIQUE : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapports pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	0	0	20	Très nomb.	1 : 900	—	03/9
10 ⁻³	1	0	2	Nombreus.	1 : 45 000		
10 ⁻⁴	0	0	0	20	1 : 225		
10 ⁻⁵	0	1	0	7			
N. A.	500	10	2 000	450 000			
10 ⁻²	1	5	0	Innombr.	1 : 2 909	<i>Empedobacter pectinovorum.</i>	03/15
10 ⁻³	1	2	0	Très nomb.	1 : 1 066		
10 ⁻⁴	0	1	0	130	—		
10 ⁻⁵	0	0,5	0	19			
N. A.	550	1 500	0	1 600 000			
10 ⁻²	0	7	0	Nombreus.	1 : 510	<i>Empedobacter pectinovorum.</i>	03/23
10 ⁻³	1	2	0	85	1 : 196		
10 ⁻⁴	0	0	0	21	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	3			
N. A.	500	1 350	0	255 000			
10 ⁻²	1	1	0	Nombreus.	1 : 136	<i>B. subtilis.</i>	03/39
10 ⁻³	1	1	0	70	1 : 75		
10 ⁻⁴	0	1	0	8	—		
10 ⁻⁵	0	0,5	0	2			
N. A.	550	1 000	0	75 000			
10 ⁻²	3	0	0	Innombr.	1 : 50 000	—	03/41
10 ⁻³	0	0	2	Très nomb.	1 : 15 000		
10 ⁻⁴	0	1	0	Nombreus.	1 : 15 000		
10 ⁻⁵	0	0	0	130			
N. A.	300	1 000	1 000	15 000 000			

LAC DOMINIQUE : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectino- lyse 26° C	Pectino- lyse 37° C	Microflore totale 26° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	—	+	+		<i>Cl. poly- myxa.</i>	03/9
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	+	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	50	0	50 000	5 000	1 : 1 000		
10 ⁻¹	+	+	+	+		—	03/15
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	+	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—			
N. A.	50	50	50 000	5 000	1 : 1 000		
10 ⁻¹	+	+	+	+		—	03/23
10 ⁻²	—	+	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	+	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—			
N. A.	50	500	50 000	500	1 : 100		
10 ⁻¹	—	—	+	+		—	03/39
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	5 000	5 000	—		
10 ⁻¹	+	+	+	+		—	03/41
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	+	—			
10 ⁻⁵	—	—	+ 1 col.	—			
N. A.	50	50	250 000	5 000	1 : 5 000		

Végétation autour du lac : mousses, séneçons, alchemilles, immortelles. Dans le lac aux périodes d'assèchement : mousses noires et vertes, plancton, vase desséchée, carex.

Échantillon 03/9 : sédiment en rive du lac en aval ; boue brune, lourde, sédimentant rapidement, beaucoup de sable très fin.

Échantillon 03/15 : sédiment en rive du lac en aval ; près du déversoir boue brune noirâtre, sableuse.

Échantillon 03/23 : sédiments superficiels présentant un aspect moiré en taches d'essence, prélevés en rive du lac dans une zone asséchée artificiellement par drainage. Boue brun noir, sableuse.

Échantillon 03/41 : prélèvement *idem* à 03/23, vase brune, homogène.

Échantillon 03/39 : sédiment prélevé sous 50 cm d'eau dans l'émergence de la source d'alimentation, vase brune, homogène.

Lac Marion.

Altitude : 3 825 m.

Profondeur faible, presque partout voisine de 50 cm, maximum 2 m. Les fluctuations saisonnières sont beaucoup moins fortes que celles du lac Dominique. Fond boueux.

Végétation :

Hautes eaux : autour du lac : limite des alchemilles, des sénéçons et des immortelles, touffes de carex abondantes, rochers nus ou avec un peu de mousse.

Moyennes eaux : petites touffes d'herbe et tapis d'herbe rase sur vase molle ou sur couche plus résistante.

Température de l'eau du rivage : 6° C, au centre 5° C.

Température de l'air : 6°-10° C, gel nocturne.

pH de l'eau : 4,6.

Échantillon 04/18 : manque.

Échantillon 04/36 : vase compacte, prélevée sous 04/18, sous 50 cm d'eau au centre du lac.

Échantillon 05/20 : sédiment superficiel prélevé près du déversoir dans une zone du rivage située en dehors des courants, vase brune, homogène.

Échantillon 05/40 : prélèvement sous-jacent à 05/20. Vase homogène, brun roux.

Échantillon 06/11 : sédiments prélevés à l'embouchure du torrent alimentant le lac. Vase brun gris, floconneuse, mélangée à un sable gris très fin.

LAC MARION : Numération de la microflore pectinolytique et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10^{-2}	0	15	0	Quant. moyenne	—		
10^{-3}	0	2	0	51	1 : 25	—	04/36
10^{-4}	0	1	0	4,5	—		
10^{-5}	0	0,5	0	3			
N. A.	0	2 000	0	51 000			
10^{-2}	0	8	0	Quant. moyenne	—		
10^{-3}	0	0	0	122	1 : 152	—	05/20
10^{-4}	0	0	1	8			
10^{-5}	0	0	0	1	1 : 12 200		
N. A.	0	800	10	122 000			
10^{-2}	1	8	0	Très nomb.	1 : 7 000	<i>Empedobacter pectinovorum</i> . <i>B. subtilis</i> .	05/40
10^{-3}	0	2	0	Nombreus.	1 : 466		
10^{-4}	0	0,5	0	51	—		
10^{-5}	0	0	0	9			
N. A.	100	1 500	0	700 000			
10^{-2}	0	10	0	Nombreus.	1 : 4 500	<i>B. subtilis</i> .	06/11
10^{-3}	0	1,5	0	30	1 : 34		
10^{-4}	0	1	0	6	—		
10^{-5}	1	0	0	3			
N. A.	10	1 300	0	45 000			
10^{-2}	0	0	0	110	—		06/33
10^{-3}	0	0	0	19	—		
10^{-4}	0	0	0	6	—		
10^{-5}	0	0	0	1			
N. A.	0	0	0	30 000			
10^{-2}	0	0	0	Nombreus.	1 : 20 000	<i>B. subtilis</i> .	08/7
10^{-3}	0	0	1	110	—		
10^{-4}	0	0	0	13			
10^{-5}	1	0	0	3,5	1 : 400		
N. A.	10	0	500	200 000			

Echantillon 06/33 : sédiments prélevés à l'embouchure du torrent alimentant le lac.

LAC MARION : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectino- lyse 26° C	Pectino- lyse 37° C	Microflore totale 26° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	—			04/36
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	50	0	5 000	500	1 : 100		
10 ⁻¹	+	—	+	+		<i>Cl. lanigani.</i>	
10 ⁻²	—	—	—	—			05/20
10 ⁻³	—	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	50	0	5 000	500	1 : 100		
10 ⁻¹	+	—	+	—		<i>Plectridium pectinovorum.</i>	
10 ⁻²	—	—	+	—			05/40
10 ⁻³	—	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	100	0	50 000	5 000	1 : 500		
10 ⁻¹	+	—	+	—		<i>Plectridium pectinovorum.</i>	
10 ⁻²	—	—	—	—			06/11
10 ⁻³	—	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	50	0	5 000	500	1 : 100		
10 ⁻¹	—	—	—	—			
10 ⁻²	—	—	+	—			
10 ⁻³	—	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	+	—			06/33
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	50 000	500			
10 ⁻¹	—	—	+	—			
10 ⁻²	—	—	+	—			
10 ⁻³	—	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	+	—			08/7
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	50 000	0			

Échantillon 08/7 : sédiments rougeâtres d'aspect ferrugineux, prélevés près du rivage.

Échantillon 08/30 : desséché et souillé.

Lac de la Lune.

Altitude : 4 035 m.

Profondeur moyenne : 14 m ; maximum : 17 m.

LAC DE LA LUNE : Numération de la microflore pectinolytique et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	3	10	0	Nombreus.	1 : 350	<i>Pseudomonas boreopolis.</i>	09/3
10 ⁻³	0,5	1,5	0	75	1 : 86		
10 ⁻⁴	0	1,5	0	13	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	4	—		
N. A.	400	1 500	0	130 000	—	—	—
10 ⁻²	2	8	0	Quant. moyenne	1 : 84	<i>B. subtilis.</i>	09/5
10 ⁻³	1	0	0	42	1 : 52		
10 ⁻⁴	0	0	0	3	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	1	—		
N. A.	500	800	0	42 000	—	—	—
10 ⁻²	0	13	0	Très nomb.	—	—	09/21
10 ⁻³	0	2	0	Nombreus.	1 : 650		
10 ⁻⁴	0	0	0	78	—		
10 ⁻⁵	0	2,5	0	13,5	—		
N. A.	0	2 000	0	1 300 000	—	—	—
10 ⁻²	0	1	0	Nombreus.	—	—	09/22
10 ⁻³	0	0	0	125	1 : 1 700		
10 ⁻⁴	0	0	0	16,5	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	4	—		
N. A.	0	100	0	170 000	—	—	—
10 ⁻²	0	0	0	Nombreus.	—	—	09/43
10 ⁻³	0	0	0	116	1 : 25 000		
10 ⁻⁴	0	0,5	0	25	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	9	—		
N. A.	0	10	0	250 000	—	—	—

Fond : généralement caillouteux avec localement des vases à débris végétaux.

Fluctuations de niveau minimales de l'ordre de 30 cm. Le lac se vide dans le lac Marion.

LAC DE LA LUNE : Numération de la microflore pectinolytique et totale anaérobie.

Dil.	Pectino-lyse 26° C	Pectino-lyse 37° C	Microflore totale 26° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	—		—	09/3
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	5 000	500	—		
10 ⁻¹	+	+	+	+		<i>Plectridium pectinovorum.</i>	
10 ⁻²	+	—	+	+			09/5
10 ⁻³	+	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	5 000	50	5 000	500	1 : 1		
10 ⁻¹	—	—	+	+		<i>Plectridium pectinovorum.</i>	
10 ⁻²	+	—	+	+			09/21
10 ⁻³	+	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	5 000	0	5 000	500	1 : 1		
10 ⁻¹	+	+	+	+		<i>Plectridium pectinovorum.</i>	
10 ⁻²	+	+	+	+			09/22
10 ⁻³	—	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	500	500	5 000	500	1 : 10		
10 ⁻¹	+	+	+	+		<i>Plectridium pectinovorum.</i>	
10 ⁻²	+	+	+	+			09/43
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	+	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	500	500	50 000	5 000	1 : 100		

Végétation : abondance de séneçons, immortelles, relativement peu d'alchemilles et lobélies.

Température de l'air : 5°5 C, gel nocturne.

Température de l'eau : 4°5 C.

pH de l'eau : 4,5.

Échantillon 09/3 : sédiment superficiel prélevé en bordure du lac. Boue brune mélangée à des débris végétaux et en petites quantités à des sables argileux fins.

Échantillon 09/5 : vase et graviers prélevés par 13 m de fond. Vase brune, organique, ligneuse.

Échantillon 09/24 : vase prélevée par 7 m de fond. Brune, homogène.

Échantillon 09/22 : vase et sédiments végétaux prélevés par 14 m de fond.

Échantillon 09/43 : sédiments à fleur d'eau, prélevés à côté d'une grève sableuse.

Lacs Blancs.

Altitude : 4 350 m.

Résulte de la récession moderne de la langue du glacier Stanley Occidental mis à découvert par la glace après 1932, entièrement libéré entre les années 1935 et 1939.

Profondeur : voisine de 1 m. Fluctuation de niveau négligeable.

Végétation :

Dans le lac : rien.

Autour du lac la colonisation débute à peine sur les accumulations morainiques situées en aval, séneçons, lobélies et immortelles sont à ras de terre. Sur les parois rocheuses bordant le lac, on remarque surtout des colonies de lichens (*Umbilicaria*).

Mesures :

Température de l'eau : 2°6 C.

Température de l'air : 4°9 C.

Neige fréquente, la surface de l'eau gèle toutes les nuits, parfois assez profondément.

pH de l'eau : 4,8.

LAC BLANC SUPÉRIEUR :

Échantillon 15/16 : vase gris verdâtre, plus débris végétaux, racines, etc., avec un peu de gravier fin, noir.

Échantillon 15/39 : vase gris verdâtre, argileuse, sous 10 cm d'eau.

Échantillon 71 (1958) : sédiment du lit du lac, vert gris, argile sableux, fin homogène.

LAC BLANC PRINCIPAL :

Échantillon 16/38 : sédiment superficiel sous 30 cm d'eau, vase très argileuse, collante, lourde, avec petits graviers fins noirs.

Échantillon 16/49 : couche sous-jacente à 16/38, vase très argileuse, collante grise, avec un peu de sable noir, fin.

Échantillon 45 (1958) : mousse brun rouille avec terre argileuse prélevée sur une pierre sous l'eau.

GLACIER STANLEY, LAC BLANC SUPÉRIEUR, LAC BLANC PRINCIPAL :

Numération de la microflore pectinolytique et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	0	0	0	9	1 : 90	<i>B. subtilis.</i>	14/19
10 ⁻³	0	0	0	1	—		
10 ⁻⁴	0,5	0	0	2,5	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	0,5	—		
N. A.	10	0	0	900			
10 ⁻²	0	0,5	0	15	1 : 180	<i>B. subtilis.</i>	14/46
10 ⁻³	0	0	0	2	1 : 36		
10 ⁻⁴	0	0	0	0,5	—		
10 ⁻⁵	0,5	1	0	0	—		
N. A.	10	50	0	1 800			
10 ⁻²	Innombr.	0	0	Innombr.	1 : 100	<i>Empedobacter pectinovorum.</i>	15/16
10 ⁻³	Nombreux.	0	0	Très nomb.	—		
10 ⁻⁴	22	0	0	Nombreux.	—		
10 ⁻⁵	4	0	0	140	—		
10 ⁻⁶	0,5	0	0	25	—		
N. A.	250 000	0	0	25 000 000			
10 ⁻²	0	0	0	Déséquil. Actino- mycètes blancs en très grand nombre.	—	—	15/39
10 ⁻³	0	0	0		—		
10 ⁻⁴	0	0	0		—		
10 ⁻⁵	0	0	0		—		
N. A.	0	0	0				

GLACIER STANLEY OCCIDENTAL :

Glacier situé au-dessus des Lacs Blancs, à 4 350 m d'altitude.

Échantillon (14/28) : terre sous mousse au front du glacier : manque.

Échantillon 14/19 : sédiment sous glace, sédiment vert, gris, argileux, mélangé avec un peu de sable noir.

Échantillon 14/46 : sédiment sous glace : même aspect que 14/19, sauf légère nuance brune.

Échantillon (14/32) : glace : manque.

GLACIER STANLEY, LAC BLANC SUPÉRIEUR, LAC BLANC PRINCIPAL :

Numération de la microflore pectinolytique et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	0	1	0	Très nomb.	—	—	16/38
10 ⁻³	0	0	0	150	1 : 1 700		
10 ⁻⁴	0	0	0	17	—		
10 ⁻⁵	0	0,5	0	3,5			
N. A.	0	100	0	170 000			
10 ⁻²	5	0	0	Très nomb.	1 : 50	<i>Empedobacter exile.</i>	16/49
10 ⁻³	3,5	0	0	180	1 : 5 000		
10 ⁻⁴	0	1	0	30	—		
10 ⁻⁵	0	1,5	0	9			
N. A.	1 000	10	0	50 000			
10 ⁻²	0	0	0	Nombreus.	1 : 13 000	<i>B. subtilis.</i>	71
10 ⁻³	0	0	0	95	1 : 13 000		
10 ⁻⁴	0	0,5	0	13	—		
10 ⁻⁵	0	0,5	0	10			
10 ⁻⁶	0,5	1	0	3			
N. A.	10	10	0	130 000			
10 ⁻²	0	0	Envahis.	Nombreus.	1 : 400 000	—	45
10 ⁻³	0	0	champ.	Nombreus.	—		
10 ⁻⁴	0	0	5	Quant. moyenne	1 : 80		
10 ⁻⁵	0	0	1,5	39			
10 ⁻⁶	0,5	0	0	7			
N. A.	10	0	50 000	4 000 000			

GLACIER STANLEY, LAC BLANC SUPÉRIEUR, LAC BLANC PRINCIPAL :

Numération de la microflore pectinolytique et totale anaérobie.

Dil.	Pectino- lyse 26° C	Pectino- lyse 37° C	Microflore totale 26° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—		—	14/19
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	500	500	—		
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+		—	14/46
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	5 000	5 000	—		
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+		—	15/16
10 ⁻⁴	—	—	+	+			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	50 000	50 000	—		
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	—		—	15/39
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	5 000	500	—		

GLACIER STANLEY, LAC BLANC SUPÉRIEUR, LAC BLANC PRINCIPAL :

Numération de la microflore pectinolytique et totale anaérobie.

Dil.	Pectino- lyse 26° C	Pectino- lyse 37° C	Microflore totale 26° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	—	+	+		<i>Cl. poly- myxa.</i>	16/38
10 ⁻²	+	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	500	0	5 000	500	1 : 10		
10 ⁻¹	—	—	+	+		<i>Cl. laniga- ni.</i>	16/49
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	+	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	10	0	5 000	500	1 : 500		

Dil.	Pectinolyse				Microflore totale				Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+		<i>Plectridium pec- tinovorum.</i>	71
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+			
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	+			
10 ⁻⁴	+	+	—	—	+	+	+	—			
10 ⁻⁵	+	—	—	—	+	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	19 000				33 000				1 : 1,7		
10 ⁻¹	+	—	—	—	+	+	+	+		—	45
10 ⁻²	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	7				7 000				1 : 1 000		

Lac Gris.

Altitude : 4 300 m.

Profondeur moyenne : 2,5 m, maximum : 4 m. Fond boueux et caillouteux. Apport non négligeable de boues glaciaires par les eaux de fonte du glacier Stanley passant sur des moraines fraîches. Fluctuation de niveau minime.

Végétation : nulle dans le fond du lac. Autour du lac, en voie de développement, non stabilisée. La colonisation a suivi pas à pas le retrait du glacier.

Mesures :

Température de l'eau : 2,6° C.

Température de l'air : 5° C.

Neige fréquente, une bonne partie de la surface gèle presque toutes les nuits.

pH de l'eau : 4,8.

LAC GRIS : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	0	40	2,5	Très nomb.	1 : 100 000	<i>B. subtilis.</i>	18/17
10 ⁻³	0	5	0	Nombreux.	1 : 200		
10 ⁻⁴	1,5	0	0	60	1 : 4 000		
10 ⁻⁵	0	0	0	13			
N. A.	10	5 000	250	1 000 000			
10 ⁻²	0	0	0	Innombr.	1 : 3 000 000	—	18/26
10 ⁻³	0	0	0	Très nomb.	—		
10 ⁻⁴	1,5	0	0	Nombreux.	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	226			
N. A.	10	0	0	30 000 000			
10 ⁻²	0	0	0	8,5	—	—	79
10 ⁻³	0	0	0	2	1 : 100		
10 ⁻⁴	0	0,5	0	1	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	1			
10 ⁻⁶	0	0,5	0	1			
N. A.	0	10	0	1 000			

Échantillon 18/17 : sédiment superficiel, boue lourde, vert gris, entremêlée de beaucoup de radicelles.

Échantillon 18/26 : sédiment superficiel : boue vert gris, légèrement teintée de brun, odeur putride qui indique vraisemblablement une pollution survenue après le prélèvement.

Échantillon 79 (1958) : sédiment du rivage, argile vert gris, avec un peu de sable fin.

LAC GRIS : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectino-lyse 26° C	Pectino-lyse 37° C	Microflore totale 36° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	—	+	+		<i>Clostridium grave</i> n. sp.	18/17
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	50	0	500	500	1 : 10		
10 ⁻¹	+	+	+	+		—	18/26
10 ⁻²	+	+	+	+			
10 ⁻³	+	+	+	+			
10 ⁻⁴	+	+	+	+			
10 ⁻⁵	—	—	+	+			
N. A.	50 000	50 000	500 000	500 000	1 : 10		

Dil.	Pectinolyse				Microflore totale				Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	—	—	—	+	+	+	+		<i>Plectridium pec- tinovorum.</i>	79
10 ⁻²	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—	+	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	7				700				1 : 100		

Lac Vert.

Altitude : 4 185 m.

Profondeur moyenne : 25 m, maximum : 37 m.

Fond : presque partout rocheux ou caillouteux. Faible apport sédimentaire du torrent venant du lac Gris. Extension limitée des sédiments. Sédiments de couleur verte (minéraux ferromagnésiens non altérés) ; sédiments de couleur mastic, vases avec boues glaciaires.

Fluctuations de niveau de l'ordre de 40 cm, selon l'état du déversoir lequel peut s'encombrer de branches mortes et de feuilles.

Végétation : Sénéçons. Immortelles et Lobélies. En bordure : Carex.

LAC VERT : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	Envahissement des plaques Résultats illisibles			—	—	—	12/10
10 ⁻³				—	—		
10 ⁻⁴	0	1	0	11	—		
10 ⁻⁵	0	1	0	2	—		
N. A.	?	?	?	110 000			
10 ⁻²	20	0	0	140	1 : 20	<i>B. subtilis.</i> <i>Angiococcus disciformis.</i>	12/32
10 ⁻³	1	1,5	0	32	1 : 80		
10 ⁻⁴	0	0,5	0	6,5	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	5	—		
N. A.	2 000	500	0	40 000			
10 ⁻²	1	1,5	0	Très nomb.	1 : 25	<i>B. subtilis.</i>	12/38
10 ⁻³	3,5	1,5	0	64	1 : 50		
10 ⁻⁴	0	1	0	7,5	—		
10 ⁻⁵	0	1	0	5	—		
N. A.	3 000	1 500	0	75 000			
10 ⁻²	5,5	0,5	0	Nombreux.	1 : 136	<i>Acinetobacter butyri.</i> <i>B. subtilis.</i>	12/14
10 ⁻³	0,5	0	0		1 : 1 500		
10 ⁻⁴	0,5	0	0		—		
10 ⁻⁵	0	0	0		—		
N. A.	550	50	0	75 000			

Mesures :

Température de l'eau : 6° C.

Température de l'air : 7,6° C. Gel nocturne, neige fréquente.

pH de l'eau : 4,9 à 5.

Échantillon 12/10 : sédiment au centre du lac, sous 30 m d'eau, vase brun gris, très légère, floconneuse.

Les 5 sédiments suivants prélevés
sous 30 cm d'eau près du rivage
forment 5 couches se superposant
les unes aux autres :

12/32
12/38
12/14
12/16
12/12

Échantillon 12/12 : sédiment vert sombre, constitué de beaucoup d'argile sableux.

LAC VERT : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	0	0	0,5	105	1 : 1 200	<i>B. subtilis.</i>	12/16
10 ⁻³	0	0	0,5	12	—		
10 ⁻⁴	0	0	0	2,5	—		
10 ⁻⁵	0,5	0	0,5	5,5	1 : 40		
N. A.	10	0	300	12 000	—		
10 ⁻²	0	7	0	10	—	—	12/12
10 ⁻³	0	0,5	0	0,5	1 : 1,4		
10 ⁻⁴	0	0	0	0,5	—		
10 ⁻⁵	0	2,5	0	0,5	—		
N. A.	0	700	0	1 000	—		
10 ⁻²	0	0	0	1,5	—	—	78
10 ⁻³	0	0,5	0	1,5	1 : 20		
10 ⁻⁴	0	0	0	1,5	—		
10 ⁻⁵	0	0,5	0	1	—		
10 ⁻⁶	0	0,5	0	1,5	—		
N. A.	0	10	0	200	—		

Échantillon 12/14 : vase vert gris, fine, mélangée avec un sable noir fin.

Échantillon 12/16 : vase vert brun, pâle, mélangée avec un peu de sable fin noir.

Échantillon 12/32 : vase verte et marron, plus débris végétaux entremêlés de sable fin, noir.

LAC VERT : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectino- lyse 26° C	Pectino- lyse 37° C	Microflore totale 26° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	—	—	+	+		<i>Cl. poly- myxa.</i>	12/10
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	+	—	+	—			
N. A.	10	0	5 000	500	1 : 500		
10 ⁻¹	—	—	+	+		—	12/32
10 ⁻²	—	—	+	—			
10 ⁻³	—	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	500	50	—		
10 ⁻¹	—	—	+	+		—	12/38
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	5 000	5 000	—		
10 ⁻¹	—	—	+	+		—	12/14
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	+	—	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	10	0	5 000	500	1 : 500		

Échantillon 12/38 : vase brune entremêlée d'une poudre de gravier noire, lourde sans débris végétaux.

Echantillon 78 (1958) : sable gris, mélangé à un peu de limon jaune d'or, plus quelques débris végétaux, prélevé en bordure du rivage.

LAC VERT : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectino- lyse 26° C	Pectino- lyse 37° C	Microflore totale 26° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—		—	12/16
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	500	500	—		
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—		—	12/12
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	500	500	—		

Dil.	Pectinolyse				Microflore totale				Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+		<i>Plectridium pec- tinovororum.</i>	
10 ⁻²	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻³	+	—	—	—	+	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—			78
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	70				70				1 : 1		

Lac Noir.

Altitude : 3 785 m.

Profondeur moyenne : 8 à 9 m, maximum : 10,5 m. Fond tapissé de sédiments encore rocheux sur places ; en colmatage par les alluvions

de la Kamusoso, torrent descendant du lac Vert. Fluctuations de niveaux minimales de l'ordre de 30 cm.

Végétation : au fond du lac quasi nulle ; autour du lac : très riche, toute la flore d'altitude avec Bruyères géantes, Sénéçons, Lobélies, Alchémilles, Immortelles.

LAC NOIR : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	4	0	0	Très nomb.	1 : 3 750	<i>B. subtilis.</i>	24/1
10 ⁻³	0	0	0	Nombreus.	—	<i>Em pedo-</i>	
10 ⁻⁴	0,5	0	0	100	—	<i>bacter pec-</i>	
10 ⁻⁵	0	0	0	18		<i>tinovororum.</i>	
N. A.	400	0	0	1 500 000			
10 ⁻²	16	0	0	Innombr.	1 : 5 550	<i>Em pedo-</i>	24/7
10 ⁻³	2	0	0	Très nomb.	—	<i>bacter pec-</i>	
10 ⁻⁴	1	0	0	Nombreus.	—	<i>tinovororum.</i>	
10 ⁻⁵	0	0	0	78			
N. A.	1 800	0	0	10 000 000			
10 ⁻²	0	1,5	0	Nombreus.	1 : 500	<i>Vibrio pi-</i>	24/40
10 ⁻³	0,5	0	0	75	1 : 666	<i>ger.</i>	
10 ⁻⁴	0	0	0	11	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	2,5			
N. A.	200	150	0	100 000			
10 ⁻²	18	10	0	Nombreus.	1 : 83	<i>Acinetobac-</i>	24/8
10 ⁻³	5	1	0	Quantité moyenne	1 : 250	<i>ter metal-</i>	
10 ⁻⁴	0	0	0	27	—	<i>caligenes.</i>	
10 ⁻⁵	0	0	0	6		<i>Em pedo-</i>	
N. A.	3 000	1 000	0	250 000		<i>bacter pec-</i>	
10 ⁻²	1	0	0	Nombreus.	1 : 400	<i>B. subtilis.</i>	24/3
10 ⁻³	1	0	0	Quantité moyenne	1 : 20 000		
10 ⁻⁴	1	1,5	0	20	—		
10 ⁻⁵	0,5	1	0	6			
N. A.	500	10	0	200 000			

Mesures :

Température de l'eau : entre 5,5° C et 7,8° C.

Température de l'air : 6,4° C, givre nocturne.

pH de l'eau : 4,6-4,8.

Échantillon 24/1 : sédiment prélevé à 7,50 m de profondeur. Boue brune, ligneuse, granuleuse, très organique.

LAC NOIR : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	Liqué- faction	0	0	Très nomb.	1 : 333	<i>Empe- do- bacter ra- dicum.</i> <i>Pseudomo- nas schuyt- killiensis.</i>	42
10 ⁻³	Très nomb.	0	0	»	—		
10 ⁻⁴	20	0	0	»	—		
10 ⁻⁵	5	0	0	Nombreux.	—		
10 ⁻⁶	1	0	0	100			
N. A.	300 000	0	0	100 000 000			
10 ⁻²	20	0	Envahis.	Très nomb.	1 : 2 000	<i>B. subtilis.</i>	49
10 ⁻³	0,5	0	2	Nombreux.	1 : 400 000		
10 ⁻⁴	0	0	0	Quantité moy.	1 : 2 000		
10 ⁻⁵	0	0	0,5	36			
10 ⁻⁶	0,5	0,5	0	10			
N. A.	2 000	10	2 000	4 000 000			
10 ⁻²	0	0	1	Très nomb.	—	—	48
10 ⁻³	0	0,5	0	Nombreux.	1 : 40 000		
10 ⁻⁴	0	0	0	130			
10 ⁻⁵	0	0	0	18	1 : 20 000		
10 ⁻⁶	0	0	0	3,5			
N. A.	0	500	100	2 000 000			
10 ⁻²	Nombreux.	0	Envahis.	Innombr.	1 : 250	<i>B. subtilis.</i> <i>Empe- do- bacter pec- tinovororum.</i> <i>Pseudomo- nas schuyt- killiensis.</i>	44
10 ⁻³	8	0	3	Très nomb.	—		
10 ⁻⁴	4	0	2	Nombreux.	1 : 500		
10 ⁻⁵	1	0	0	95			
10 ⁻⁶	0,5	0	0	10			
N. A.	40 000	0	20 000	10 000 000			

Échantillon 24/7 : sédiment prélevé à l'embouchure du torrent d'alimentation, vase brune, collante, sèche avec un peu de sable.

LAC NOIR : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectino- lyse 26° C	Pectino- lyse 37° C	Microflore totale 26° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	—	+	+		<i>Plectridium pectinovo- rum.</i>	24/1
10 ⁻²	+	—	+	+			
10 ⁻³	+	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	5 000	0	5 000	5 000	1 : 1		
10 ⁻¹	—	—	+	+		—	24/7
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	+	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	0	0	50 000	5 000	—		
10 ⁻¹	+	—	+	+		<i>Plectridium pectinovo- rum.</i>	24/40
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	50	0	5 000	5 000	1 : 100		
10 ⁻¹	+	—	+	+		<i>Plectridium pectinovo- rum.</i>	24/8
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	50	0	5 000	5 000	1 : 100		
10 ⁻¹	+	—	+	+		<i>Plectridium pectinovo- rum.</i>	24/3
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+			
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	50	0	5 000	5 000	1 : 100		

Echantillon 24/80, 8, 3 sédiments formant 3 couches constituées essentiellement de graines de carex, très peu décomposées, brunes.

40

8

3

LAC NOIR : Numération de la microflore pectinolytique et totale anaérobie.

Dil.	Pectinolyse				Microflore totale				Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10^{-1}	+	—	—	—	+	+	+	+		—	42
10^{-2}	—	—	—	—	—	+	+	+			
10^{-3}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-4}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-5}	—	—	—	—	+	—	—	—			
10^{-6}	—	—	—	—	+	—	—	—			
N. A.	7				110 000				1 : 15 700		
10^{-1}	+	—	—	—	+	+	+	+		—	49
10^{-2}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-3}	—	—	—	—	—	+	—	—			
10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—			
10^{-5}	—	—	—	—	—	—	—	—			
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	7				5 000				1 : 715		
10^{-1}	—	—	—	—	+	+	+	+		—	48
10^{-2}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-3}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-4}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-5}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-6}	—	—	—	—	+	—	—	—			
N. A.	0				700 000				—		
10^{-1}	—	—	—	—	+	+	+	+		—	44
10^{-2}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-3}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—			
10^{-5}	—	—	—	—	—	—	—	—			
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	0				5 000				—		

1958 :

Echantillon 42 : terre sous mousse, brune, légère, avec des rhizoïdes de mousses, humus brun, très coloré, prélevé en bordure du rivage.

Échantillon 49 : terre brune, légère, avec débris de radicelles, humus brun très coloré (bordure du rivage).

Échantillon 48 : mousse verte, plus terre brune et débris végétaux prélevés sous l'eau en rive du lac.

Échantillon 44 : terre très légère, beaucoup d'humus brun noir, entrecoupée de radicelles, pH d'environ 6.

Lac Catherine.

Altitude : 4 050 m.

Profondeur moyenne : 5 m, maximum : 10 m.

Fluctuations de niveau faibles.

LAC CATHERINE : Numération de la microflore pectinolytique et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	8	0	0	Nombreux.	1 : 170	<i>Empedobacter pectinovorum.</i> <i>Pseudomonas boreopolis.</i>	17/48
10 ⁻³	1	0	0	110	1 : 17 000 —		
10 ⁻⁴	0,5	0	0	17			
10 ⁻⁵	0	0,5	0	5			
10 ⁻⁶	0	0	0	0			
N. A.	1 000	10	0	170 000			
10 ⁻²	0	0	0	Innombr.	1 : 1 600	<i>B. subtilis.</i> <i>Angiococcus disciformis.</i>	17/50
10 ⁻³	1	0	0	Très nomb.	—		
10 ⁻⁴	0,5	0	0	160	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	14			
N. A.	1 000	0	0	1 600 000			
10 ⁻²	0	0	0	Innombr.	?	—	17/44
10 ⁻³	0	0	0	»			
10 ⁻⁴	0	0	0	Très nomb.			
10 ⁻⁵	0	0	0	580			
N. A.	?	?	?	60 000 000			

Végétation : dans le lac, presque nulle, autour du lac : forêt imposante de vieux Sénéçons en peuplement monotype, en bordure du lac, la flore plus complexe à Lobélies, Immortelles, Alchémilles.

LAC CATHERINE : Numération de la microflore pectinolytique et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10^{-2}	0	6	0,5	Innombr.	1 : 3 000	<i>B. subtilis.</i>	40
10^{-3}	1	5,5	0	Très nomb.	1 : 500		
10^{-4}	0,5	0,5	0	Nombreux.			
10^{-5}	0	0	0	28	1 : 30 000		
10^{-6}	0	0	0	6			
N. A.	1 000	6 000	100	3 000 000			
10^{-2}	3	2,5	0	Quantité moyenne	1 : 50	<i>B. subtilis.</i>	41
10^{-3}	0	0	0	15	1 : 60		
10^{-4}	0	0	0	2,5	—		
10^{-5}	0	0	0	4			
N. A.	300	250	0	15 000			
10^{-2}	0	0,5	0	Nombreux.	1 : 800	<i>P. sauro-</i>	46
10^{-3}	0,5	0	0	»		<i>mali.</i>	
10^{-4}	0,5	0	0	78	1 : 8 000	<i>B. subtilis.</i>	
10^{-5}	0	0,5	0	8	—		
10^{-6}	0	0	0	9			
N. A.	1 000	100	0	800 000			

Mesures :

Température de l'eau : 6,1° C.

Température de l'air : 7° C.

pH de l'eau : 5 à 5,2.

Échantillon 17/48 : sédiment rougeâtre, prélevé au bord du rivage, en amont du lac.

Échantillon 17/50 : sédiment superficiel sous 20 cm d'eau, boue floconneuse, brun rouge, légère.

Échantillon 17/44 : couche sous-jacente à 17/50, boue brun gris, légère, floconneuse.

Prélèvements 1958 :

Échantillon 40 : vase-boue, brune, légère, uniforme, prélevée au rivage.

LAC CATHERINE : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectino- lyse 26° C	Pectino- lyse 37° C	Microflore totale 26° C	Microflore totale 37° C	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—		—	17/48
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—			
N. A.	o	o	500	50	—		
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+		—	17/50
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	o	o	5 000	5 000	—		
10 ⁻¹	—	—	+	+			
10 ⁻²	—	—	+	+			
10 ⁻³	—	—	+	+		—	17/44
10 ⁻⁴	—	—	+	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	o	o	50 000	5 000	—		

Échantillon 41 : gravier-sable, un peu de sédiment argileux gris blanc, prélevé au rivage.

Échantillon 46 : vase légère, vert gris, composée principalement d'algues de toutes sortes baignant dans beaucoup d'eau, prélevée au rivage.

LAC CATHERINE : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectinolyse				Microflore totale				Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+		<i>Plectridium pectinovorum</i>	40
10^{-2}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-3}	—	—	—	—	+	+	+	—			
10^{-4}	—	—	—	—	+	—	—	—			
10^{-5}	—	—	—	—	—	—	—	—			
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	50				3 300				1 : 66		
10^{-1}	—	—	—	—	+	+	+	+		—	41
10^{-2}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-3}	—	—	—	—	—	—	—	—			
10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—			
10^{-5}	—	—	—	—	—	—	—	—			
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	0				500				—		
10^{-1}	—	—	—	—	+	+	+	—		—	46
10^{-2}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-3}	—	—	—	—	+	+	+	+			
10^{-4}	—	—	—	—	+	+	—	—			
10^{-5}	—	—	—	—	—	—	—	—			
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	0				12 000				—		

Lacs Kitandara.

Inférieur.

Supérieur.

Altitude : 3 800 m.

Lacs très peu profonds, donnant plutôt l'aspect de marécage ou de tourbière. Profondeur maximum : 14 m (Sup.), 11 m (Inf.).

Végétation : rien à l'intérieur même du lac, autour marécage, avec Carex, Sphaignes, Graminées, Lobélies, Sénéçons (Carex dominants).

Mesures :

pH de l'eau : 6,6.

Température de l'eau : 4,5°-5,5° C.

Prélèvements faits en 1958 :

Échantillon 47 (Inférieur) : sédiment prélevé au bord du lac, pâte vert brun, constituée de boue et d'Algues et de débris d'origine animale et végétale.

LAC KITANDARA INFÉRIEUR, LAC KITANDARA SUPÉRIEUR :

Numération de la microflore pectinolytique et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	0	3,5	0	Quantité moyenne		<i>B. subtilis.</i>	47
10 ⁻³	0,5	0,5	0	40	1 : 5 000		
10 ⁻⁴	0	2	0	9	1 : 125		
10 ⁻⁵	0	0	0	3	—		
10 ⁻⁶	0	0,5	0	3,5			
N. A.	10	400	0	50 000			
10 ⁻²	0	0	0	Nombreux.	1 : 50 000	<i>B. subtilis.</i>	74
10 ⁻³	0	0	0	Quantité moyenne	—		
10 ⁻⁴	0,5	0	0	41	—		
10 ⁻⁵	0	0	0	6			
10 ⁻⁶	0	0	0	2			
N. A.	10	0	0	500 000			
10 ⁻²	Très nomb.	0	0	Innombr.	1 : 222	<i>Achromobacter sewerini.</i>	72
10 ⁻³	35	0	0	Très nomb.	1 : 1 000 000		
10 ⁻⁴	4,5	0	0	Nombreux.			
10 ⁻⁵	0,5	1	0	85	1 : 1 000 000		
10 ⁻⁶	0,5	0	0,5	12,5			
N. A.	45 000	10	10	10 000 000			

Échantillon 74 (Inférieur) : boue brun gris, légère, homogène, prélevée au rivage.

Échantillon 72 (Supérieur) : vase légère, brun gris, floconneuse, homogène, prélevée au rivage.

LAC KITANDARA INFÉRIEUR, LAC KITANDARA SUPÉRIEUR :

Numération de la microflore pectinolytique et totale anaérobie.

Dil.	Pectinolyse				Microflore totale				Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+		<i>Plectridium pectinovorum</i>	47
10 ⁻²	+	+	+	—	+	+	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—	+	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	230				700				1 : 3		
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+		<i>Plectridium pectinovorum</i> <i>Clostridium eruptens</i>	74
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+			
10 ⁻³	+	+	+	—	+	+	+	—			
10 ⁻⁴	+	+	+	—	+	+	+	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	6 000				6 000				1 : 1		
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+		<i>Plectridium pectinovorum</i>	62
10 ⁻²	+	+	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—	+	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	120				700				1 : 6		

PRÉLÈVEMENTS EFFECTUÉS EN DEHORS DU MASSIF DU RUWENZORI

Prélèvements 1958	{	Lac du Visoke (volcan).
		Cratère et solfatare du Nyamuragira (volcan).
		Sources chaudes (94° C) de May-Ya-Moto (plaine de Rwindi).
1956	{	Lac salé de Katwé (Uganda).

Lac du Visoke.

(Lac situé dans le cratère d'un volcan).

Altitude : 3 420 m.

Profondeur du lac : 15-20 m.

LAC DU VISOKE : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	Nombreux.	0	0	Très nomb.	1 : 25	<i>Achromo- bacter ve- nenosum.</i>	118 A
10 ⁻³	20	0	0	Nombreux.			
10 ⁻⁴	2	0	0	44	1 : 50 000		
10 ⁻⁵	0	0,5	0	5,5	—		
10 ⁻⁶	0,5	0	0	5,5			
N. A.	20 000	10	0	500 000			
10 ⁻²	0	0	0	Très nomb.	1 : 70 000	<i>B. subtilis.</i>	118 B
10 ⁻³	0	0	0	Nombreux.			
10 ⁻⁴	0,5	0,5	0	64	1 : 70 000		
10 ⁻⁵	0,5	0	0	7	—		
10 ⁻⁶	0	1	0	2,5			
N. A.	10	10	0	700 000			

LAC DU VISOKE : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectinolyse				Microflore totale				Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+		<i>Clostridium la- niganii.</i>	118 A
10 ⁻²	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—	+	+	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	50				1 200				1 : 24		
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+		<i>Plectridium pec- tinovororum.</i>	118 B
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+			
10 ⁻³	+	—	—	—	+	+	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	700				3 300				1 : 4,7		

Ce lac ne reçoit que de l'eau de pluie et ne possède pas de végétation sur son fond.

Végétation autour du lac : Sénéçons, Sphaignes, Graminées multiples.

Température de l'eau en surface : 7,5°-10° C (6,5° C).

Température de l'air : + 10° C.

pH de l'eau : 5,5-6,0.

Prélèvements :

118 A : boue-vase homogène, précipitant en fins flocons bruns, pH 5,5 à 6.

118 B : boue-vase brune, fine, homogène, légère, pH 5,5 à 6. Vase du fond du lac au point le plus profond.

Nyamuragira (volcan en activité).

Volcan composé d'un premier cratère éteint, à l'intérieur duquel se trouvent plusieurs failles actives. Sur les flancs et à l'intérieur du grand cratère, d'autres petits volcans avec solfatares se constituent (fig. 11).

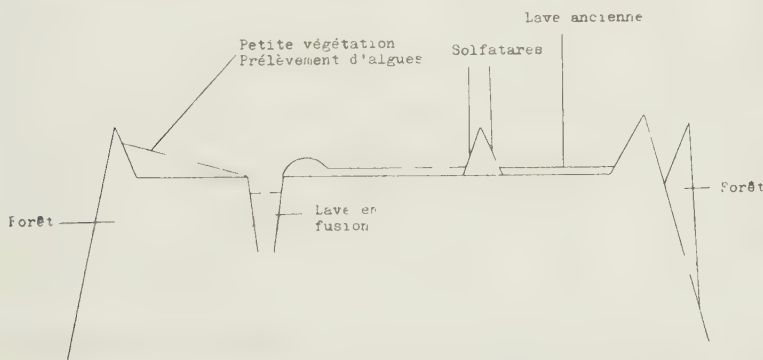


FIG. 11. — Coupe schématique du Nyamuragira.

Échantillons : très hétérogènes.

109 : amas d'Algues vertes et blanches qui poussent sur le sol dans le fond du cratère.

108 M : mousse brune avec débris de terre brune poussant sur les flancs du volcan.

NYAMURAGIRA : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total.	Bactéries isolées	E
10 ⁻²	8	0	0	Innombr.	1 : 13 000		
10 ⁻³	0	1	0	Très nomb.			
10 ⁻⁴	0	0	0	Nombrous.	1 : 26 000	—	109
10 ⁻⁵	0	0	0	123	—		
10 ⁻⁶	0	0	0	12,5			
N. A.	1 000	500	0	13 000 000			
10 ⁻²	0	0	10	20	—		
10 ⁻³	0	0,5	0	8	1 : 200		
10 ⁻⁴	0	0	0	1,5	1 : 2	—	108 M
10 ⁻⁵	0	0	0	2			
10 ⁻⁶	0	0	0	1,5			
N. A.	0	10	1 000	2 000			
10 ⁻¹	0	0	0	0	—		
10 ⁻²	0	0	0	1,5	—	—	
10 ⁻³	0	0	0	0			108 G
10 ⁻⁴	0	0	0	0,5	—		
N. A.	0	0	0	10			
10 ⁻¹	0	0	0	0	—		
10 ⁻²	0	0	0,5	0,5	—	—	
10 ⁻³	0	0	0	0,5	(1 : 1)		108 S
10 ⁻⁴	0	0	0,5	0,5			
N. A.	0	0	10	10			

108 G1 : Échantillon prélevé dans un solfatare du Nyamuragira : gravier-sable multicolore avec grains de soufre.

108 S : prélevé dans un solfatare, gravier-sable, gris blanc, avec granules de soufre.

NYAMURAGIRA : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectinolyse				Microflore totale				Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	+	+	—	+	+	+	+		<i>Plectridium pectinovorum</i>	109
10 ⁻²	+	+	+	—	+	+	+	+			
10 ⁻³	+	+	+	—	+	+	+	+			
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	+	+			
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+	+	+			
10 ⁻⁶	+	+	—	—	+	+	—	—			
N. A.	1 500 000				3 000 000				1 : 2		
10 ⁻¹	—	—	—	—	+	+	+	+		—	108 M
10 ⁻²	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—	+	+	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	0				1 900				—		
10 ⁻¹	—	—	—	—	—	—	—	—		—	108 G
10 ⁻²	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	0				0				—		
10 ⁻¹	—	—	—	—	—	—	—	—		—	108 S
10 ⁻²	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻³	—	—	—	—	+	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	—	—	—			
N. A.	0				?				—		

Sources chaudes de May-Ya-Moto (Plaine du Rwindi).

Il s'agit de trous de 20 à 50 cm de diamètre où bout de l'eau (94° C), avec de nombreuses Algues. Cette eau déborde de temps à autre et se jette dans une rivière proche. Ces trous sont entourés d'une savane caillouteuse.

Échantillons :

121 A : boue sableuse, fine, brun gris.

MAY-YA-MOTO : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10^{-2}	0	0	0	5,5	—		121 A
10^{-3}	0	0	0	3	—		
10^{-4}	0	0	0	3,5	—		
10^{-5}	0	0	0	3			
10^{-6}	0	0	0	1,5			
N. A.	0	0	0	600			
10^{-2}	1	0	0	Quantité moyenne	1 : 400	<i>B. subtilis.</i>	121 B
10^{-3}	1	0	0,5	38	1 : 4 000		
10^{-4}	0	0,5	0	4,5			
10^{-5}	0	0	0	3	1 : 4 000		
10^{-6}	0	0	0	3			
N. A.	100	10	10	40 000			
10^{-2}	5	0	0	Nombreux.	1 : 200	<i>B. subtilis.</i>	121 C
10^{-3}	1	0,5	0	60		<i>Endosporus</i>	
10^{-4}	1	0	0	20	1 : 10 000	<i>pravus</i> n.	
10^{-5}	0,5	0	0,5	5	1 : 10 000	sp.	
10^{-6}	0	0	0	5			
N. A.	500	10	10	100 000			

A 57° C :

Pectinolyse Microflore totale	{	121 A, B, C .	0 partout
		121 A . . .	0
		121 B . . .	18 (10^{-1} : 2 tubes) (10^{-2} : 1 tube)
		121 C. . . .	12 (10^{-1} : 2 tubes)

121 B : amas d'Algues et de boue brun gris, légère, forte odeur de putréfaction (H_2S). Le microscope montre de très nombreuses Bactéries.

121 C : amas de filaments d'Algues, mêlé de boue, brune, fine, légère.

Les échantillons ont été analysés à 30° C et à 57° C : les milieux sur plaques se liquéfiant partiellement à 57° C, ils sont remplacés par des milieux en tubes « Vr » capuchonnés pour éviter l'évaporation. Ces

MAY-YA-MOTO : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectinolyse				Microflore totale				Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+			
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+			
10 ⁻³	+	(+)	(+)	—	+	+	+	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—		—	121 A
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	1 200				2 300				1 : 1,9		
10 ⁻¹	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻²	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—	+	+	+	+		—	121 B
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	0				500 000				—		
10 ⁻¹	+	—	—	—	+	+	+	+		<i>Plectridium pectinovorum</i>	
10 ⁻²	—	—	—	—	+	+	+	+			
10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	—	—	—			
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	—			
N. A.	7				500				1 : 71		

A 57° C :

Pectinolyse : 121 A, B, C : 0 partout

Microflore totale : 121 A, B, C : 0 partout

milieux, liquides à cette température, doivent être ramenés à la température de la chambre pour estimer la pectinolyse (4 tubes pour chaque dilution).

Lac salé de Katwé (Uganda).

Altitude : 900 m.

1 échantillon : 11/49 (expédition 1956 : sédiment prélevé en rive du lac près d'une saline, dépôts de sylvinite. Région abondante en hippopotames. Boue grise, fine, eau d'une couleur de rouille

LAC SALÉ DE KATWÉ : Numération de la microflore pectinolytique
et totale aérobie.

Dil.	Bactéries pectinolytiques	Actinom.	Champ.	Total des colonies	Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
10 ⁻¹	1	1	0	40	1 : 100	<i>B. subtilis.</i>	11/49
10 ⁻²	1	0	0	16	1 : 100		
10 ⁻³	0	0,5	0	6	—		
10 ⁻⁴	0	0,5	0	3	—		
N. A.	10	10	0	1 000			

LAC SALÉ DE KATWÉ : Numération de la microflore pectinolytique
et totale anaérobie.

Dil.	Pectinolyse		Microflore		Rapport pect./total	Bactéries isolées	E
	à 26°	à 37°	à 26°	à 37°			
10 ⁻¹	+	+	+	+			
10 ⁻²	—	—	—	—			
10 ⁻³	—	—	—	—		—	11/49
10 ⁻⁴	—	—	—	—			
10 ⁻⁵	—	—	—	—			
N. A.	50	50	50	50	1 : 1		

CONCLUSIONS

Ces lacs de haute montagne possèdent des facteurs physico-chimiques et biologiques qui sont tous défavorables à la croissance des microorganismes : froid persistant, pH du sol en général acide, sols peu évolués souvent voisins de la roche mère, pauvreté ou absence de végétation aquatique. Aussi ne sommes-nous pas surpris de trouver des résultats numériquement inférieurs à ceux des échantillons français. La longue conservation des boues à la glacière et sans doute aussi le transport ont

également contribué à l'appauvrissement en microorganismes, cependant, pour d'autres prélèvements plus riches, les mêmes causes ont été l'objet d'un déséquilibre net, entraînant la pullulation d'un ou de plusieurs microorganismes (15/16, 15/39, 17/44, 18/26, 42, 72, 109). Nous pensions encore attribuer aux mêmes facteurs le manque de microorganismes thermophiles dans l'analyse des sources chaudes de May-Ya-Moto, mais H. Mollaret a ensemencé ces vases directement après le prélèvement et a observé une grande abondance de mésophiles et l'absence de thermophile. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Mais, il est certain que les pectinolytiques que nous avons isolés dans ces sources n'y subsistent qu'à l'état sporulé.

L'ensemble de cette étude nous montre que la pectinolyse est assurée par les mêmes groupes de germes dans les lacs du Ruwenzori et dans les terres et boues européennes.

Les *Pseudomonadacées* (25 souches) nous livrent quelques espèces intéressantes : ce sont les *Empedobacter* que nous retrouvons le plus souvent : *E. pectinovorum* y tient la plus grande place et s'isole à nouveau dans les échantillons riches en débris végétaux. Il possède, comme nous le verrons plus loin, les mêmes caractéristiques que ceux trouvés en Europe. Ce germe isolé récemment par Dorey (31) et par nous fait donc partie de la microflore originelle. De plus, sa découverte au Ruwenzori étend son aire de répartition à l'Afrique. Dans un sédiment pauvre et argileux du lac Blanc (16/49) se trouvait un bâtonnet semblable à *E. pectinovorum*, mais non gélatinolytique. Une étude plus approfondie (p. 211) nous a montré qu'il s'agissait d'une espèce nouvelle nommée *Empedobacter exile*. Il est bien difficile d'en préciser l'écologie car nous ne possédons que cette unique souche ; aucun de ces germes n'a été isolé dans les échantillons européens.

Le lac Noir qui reçoit les eaux de plusieurs lacs possède des sédiments beaucoup plus riches en matière organique ; l'altitude moindre permettant sans doute une croissance plus abondante de la flore. Les Bactéries sont ainsi davantage stimulées et la microflore pectinolytique plus variée. L'échantillon n° 44 nous montre un *Empedobacter* semblable à *pectinovorum* par sa morphologie, mais identique à *E. dormitator* par ses caractères physiologiques. Le même germe avait été isolé par Wright (10) dans une eau douce de Philadelphie, puis par Harrison (10) sur la peau d'une morue dans l'Océan Pacifique, au large du Canada. Ceci nous montre combien ce pectinolytique est répandu et comme il s'adapte à des habitats très divers.

L'*Empedobacter* du n° 42, plus épais, se rattache d'emblée à la nouvelle espèce *E. radicum* trouvée ci et là dans les boues européennes. Il n'en diffère que par l'alcalinisation plus lente du lait. Nous en avons fait la variété *ruwenzorii*.

Nous avons d'abord pris la souche 17/48 pour une *Erwinia* (lac Catherine). En effet, elle dégagait du CO_2 dans les milieux glucidiques et nitrates. Mais ce dégagement de gaz provenait des nitrates inclus dans les milieux ; un pigment vert apparut ensuite ce qui ramenait définitivement cette souche au genre *Pseudomonas*. L'espèce a été difficile à préciser, nous nous sommes tourné vers *Ps. boreopolis* dont la description concorde dans les grandes lignes avec celle de notre souche. Cette Bactérie a été retrouvée dans le lac de la Lune, sur l'autre versant du massif, ce qui indique sa vaste répartition dans le Ruwenzori. Cette souche (09/3) diffère cependant du 17/48 par l'absence d'aérogénèse.

Il serait vain d'épiloguer sur le vrai rôle de *Pseudomonas sauromali*, car si Conti et Crowley (10) l'ont reconnu responsable de certaines tumeurs des lézards (*Sauromalus varius*), nous lui avons adjoint l'étiquette de pectinolytique. Notre souche qui possède les mêmes caractéristiques que le germe de Conti a été isolée dans le lac Catherine.

Retournons au lac Noir : dans 2 échantillons (42, 44) rapportés en 1958, nous trouverons un *Pseudomonas* maintenant familier : *Ps. schuylikillensis*. Ce germe dont les propriétés pectinolytiques n'étaient pas connues jouit donc d'une aire de répartition très vaste. Isolé en Amérique, dans la rivière Schuylkill, nous l'avons retrouvé dans quelques exemplaires européens.

C'est grâce au Professeur J. Brisou qu'un nom a pu être donné aux quelques souches appartenant au groupe *Achromobacter-Acinetobacter*. Elles ont été isolées dans des lacs très différents où elles se trouvaient parfois, en abondance. Ce sont hélas ! des germes fragiles. Malgré la conservation en glacière, les deux souches les plus intéressantes sont mortes : *Acinetobacter metalcaligenes*, isolé à nouveau du lac Noir, et *Achromobacter venenosum* qui pullule dans un échantillon du lac du Visoke. *Achromobacter sewerini* qui digère très peu la pectine s'est maintenu en vie jusqu'ici ; c'est une souche capricieuse, se cultivant difficilement et lentement et dont nous n'avons jamais pu retirer d'enzyme pectinolytique. Elle a été isolée du lac Kitandara. *Acinetobacter butyri* ou une variété de ce germe a été trouvée dans le lac Vert. Comme dans les terres européennes, nous rencontrons les espèces de ce groupe très sporadiquement, et il est alors difficile d'en préciser la biologie. Elles ne semblent être que des pectinolytiques occasionnels à l'encontre des *Empedobacter* ou des *Pseudomonas* que l'on trouve d'une manière beaucoup plus régulière. Signalons encore que les espèces mentionnées n'ont pas été rencontrées dans les échantillons européens. Elles paraissent adaptées au sol et aux végétaux ; car elles ne poussent pas sur les milieux à base de viande.

Nous quittons la famille des *Pseudomonadaceae* si importante du point de vue de la pectinolyse, pour aborder grâce à une souche malheureu-

sement unique celle des *Vibrionaceæ*. Jusqu'ici aucune espèce pectinolytique n'avait été mentionnée dans celle-ci. Notre souche 24/40, isolée du lac Noir, possède un pigment orange semblable à celui des *Empedobacter*. Cette espèce n'attaque pas la cellulose : il est alors impossible d'en faire un *Cellvibrio*, comme nous l'avions pensé tout d'abord. Reste le genre *Vibrio* dans lequel aucune Bactérie semblable n'a été décrite ; il s'agit donc d'une espèce nouvelle nommée *Vibrio piger*, son pouvoir pectinolytique est toutefois extrêmement faible, quoique net ; aussi n'avons-nous pu étudier ses enzymes. On n'attachera pas trop d'importance à cette famille peu ou non pectinolytique. Il en est tout autrement pour les *Myxobactéries* dont le pouvoir de dépolymériser de grosses molécules est connu depuis longtemps. Aussi bien dans les sols européens que dans le Ruwenzori, les espèces pectinolytiques semblent rares, s'isolant ici et là dans des endroits très divers. Elles ont peut-être un rôle important dans des endroits plus spécifiques que nous n'avons pas étudiés ? Mais les quelques souches rencontrées sont fortement pectinolytiques, produisant des enzymes en grande quantité. Les deux souches isolées : l'une dans le lac Vert, l'autre dans le lac Catherine appartiennent à l'espèce *Angiococcus disciformis*. Cette Bactérie qui n'était pas connue pour son pouvoir pectinolytique forme de ravissantes colonies orangé en forme de choux-fleurs. Hélas, les cultures sont très capricieuses et nos deux souches ne sont plus en vie.

Passons maintenant aux *Sporulales* et, avec les aérobies, au genre *Bacillus*. Nous retrouvons, comme pour les terres d'Europe, le très commun *B. subtilis* (25 souches isolées). Grâce à sa spore très résistante, il demeure dans les échantillons les plus pauvres. Dans de nombreuses boîtes, cette Bactérie nous donne l'impression d'avoir été introduite comme souillure par l'air : par exemple, dans les échantillons 06/11, 08/7, 14/19 ; 14/46, une colonie s'implante brusquement dans les dernières dilutions alors qu'aucun pectinolytique ne s'était montré auparavant. Ces résultats sont donc suspects. Ce n'est pas le cas pour d'autres boues 12/32, 12/38, 49, entre autres, où ce germe se trouve en abondance avec un nombre de godets proportionné aux dilutions.

Nous quittons le genre *Bacillus* avec les germes à sporanges renflés par la spore. Une souche intéressante a été isolée des sources chaudes de May-Ya-Moto. Cet aérobie possède une spore qui déforme latéralement le corps microbien. Toutefois, les caractères physiologiques diffèrent nettement de ceux de *Bacillus laterosporus*. C'est donc une espèce nouvelle nommée *Endosporus pravus*.

Nous n'avons vu *Clostridium polymyxa* que rarement et en très petite quantité (03/9, 12/10, 16/38). Ce n'est pas étonnant car nous avons montré dans l'étude des sols européens que cette espèce habite les terres et non les eaux et boues où elle est remplacée par des anaéro-

bies stricts. Parmi ces derniers, *Plectridium pectinovorum* (24 souches) est sans conteste, le plus fréquent au Ruwenzori. Les souches rencontrées dans ce massif diffèrent très légèrement des souches européennes en ce qu'elles possèdent une gélatinase très faible. Celle-ci passerait inaperçue et pourrait faire croire à une espèce nouvelle si l'on ne travaillait pas avec la technique de Kohn.

Pl. pectinovorum est particulièrement abondant dans les boues à forte teneur en matière organique ; nous l'avons notamment trouvé dans tous les prélèvements du lac de la Lune et du lac Noir. Il pullulait dans une sorte de gelée alguale, récoltée dans le cratère du Nyamuragira (109). Sa spore lui permet de résister à la température (94° C) des sources chaudes de May-Ya-Moto. Il ne craint pas les lieux désertiques tels les lacs Blancs où nous l'avons trouvé en abondance dans un sédiment argileux, d'apparence pauvre (71).

Les autres anaérobies stricts tous des *Clostridium* se rencontrent irrégulièrement au hasard des échantillons ; ainsi le très gros bâtonnet isolé du lac Gris (18/17), qui par ses énormes sporanges en navettes ressemble à *Clostridium pectinolyticum*. Sa gélatinase cependant le distingue de ce dernier et en fait une espèce nouvelle *Clostridium grave*. Le *Clostridium* de Lanigan (*Cl. laniganii*), primitivement australien, est un *Clostridium* très répandu puisque nous le retrouvons avec trois souches dans les hauts massifs de l'Afrique Centrale. Les lacs qui le contiennent sont assez éloignés les uns des autres : le lac du Visoke (souche 118 A) se situe même en dehors du Ruwenzori. Rappelons qu'on rencontre très régulièrement ce germe dans les boues et les sols européens. Les mêmes termes s'appliquent à *Clostridium eruptens*, isolé tout récemment des terres japonaises par S. Sugama. Les lacs Dominique et Kitandara en ont livré chacun une souche (03/23, 74). Il se distingue de *laniganii* par son pouvoir protéolytique (digestion du blanc d'œuf et de la caséine).

Nous sommes surpris de n'avoir trouvé que des pectinolytiques anaérobies non pigmentés qui dominaient aussi, il est vrai, dans les échantillons français : mais, dans ceux-ci, nous avons aperçu *Pl. virens* de temps à autre et isolée, dans les eaux de Dax, une souche très active de *Clostridium felsineum*. Au Ruwenzori, aucun tube à pectinolyse positive ne se trouve pigmenté. Les souches isolées viennent davantage encore confirmer cette lacune. Ces résultats confirment ceux plus anciens de Ruschmann et Bartram. Ils ont montré que, dans les rivières chaudes, les *Clostridium* pigmentés (*Cl. felsineum*) dominaient alors qu'au cours du rouissage, en rivière froide, c'était *Pl. pectinovorum* le germe principal.

Nous ne pouvons terminer cette revue systématique sans mentionner les deux grands groupes des *Actinomyces* et des *Champignons*. Comme

dans les autres régions, ils ont au Ruwenzori toute leur importance. Les Actinomycètes, surtout ont été dénombrés dans maints échantillons. Les Champignons sont moins souvent rencontrés et cela s'explique aisément par le fait que nous sommes en présence de substrats à rH bas. Mais ils prennent certainement beaucoup d'importance dans les lacs à fluctuations de niveau passant par des périodes d'assèchement.

Il est difficile d'évaluer la contribution de chacun des grands groupes à la fonction pectinolytique. On peut penser que les anaérobies, surtout *Pl. pectinovorum* sont très à l'aise dans ces sédiments lacustres peu aérés et, pourtant, le froid persistant doit les gêner. Sous faible couche d'eau, dans les rivages ou les bords marécageux, les aérobies sont certainement aussi efficaces. C'est d'ailleurs ce que nous a montré la numérotation des pectinolytiques dans les litières de roseaux (p. 76) où les anaérobies voisinent en grande quantité avec un nombre important d'*Empedobacter*.

CHAPITRE III

L'ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE DANS LA RHIZOSPHERE

Lambina (82) étudiant la fonction protopectinasique dans les champs, composés de Graminées et de trèfles, affirme que l'activité des germes pectinolytiques (ici *Cl. polymyxa*) y atteint son maximum au contact des racines pendant la 2^e et la 3^e année après la plantation du champ.

Quelques expériences préliminaires nous avaient montré l'intérêt que l'étude de cette question pouvait avoir. Aussi, avons-nous été incité à approfondir ce chapitre fort peu connu.

Des graines de plantes très diverses ont donc été semées en pots, dans un mélange à partie égale de terreau de feuilles et de terre de grande culture (*). Placées au mois de février en serre chaude, elles ont continué leur croissance dans le jardin de l'Institut Pasteur depuis le mois de mars, jusqu'aux mois de juin et juillet.

Une autre partie de cette étude est faite avec des plantes d'ornement cultivées en pot dans le même mélange de terre depuis 1 ou 2 ans, ou avec des plantes prélevées directement en pleine terre de jardin ou de grande culture.

Les plantes en fleurs sont dépotées ou déterrées et les racines sont nettoyées de toute terre. Il reste alors une fine pellicule de terre sur les racines (d'environ 0,1-0,2 mm d'épaisseur). Celles-ci sont alors secouées dans un récipient stérile contenant de l'eau distillée stérile. La terre mise en suspension est centrifugée. On récolte ainsi 0,5-1 g de terre du rhizoplan. Comme terre témoin, on prélève différents échantillons dans le pot de culture même ou dans le chevelu de racine, si la plante croît en pleine terre. Les terres témoins sont donc prélevées dans la rhizosphère éloignée (édaphosphère) et subissent le même traitement que celles du rhizoplan (suspension dans l'eau distillée stérile et centrifugation).

(*) Nous remercions vivement la maison Vilmorin-Andrieux qui nous a offert gracieusement les graines.

En divisant le N. A. des Bactéries du rhizoplan par le N. A. des Bactéries de l'édaphosphère, on obtient le coefficient de la rhizosphère. Lorsque ce coefficient dépasse 1, il y a stimulation des germes par les racines ; lorsque le coefficient est négatif, il y a inhibition des germes.

I. — PÉLARGONIUM ZONALE

Plante en pot depuis 2 ans. Alternativement en serre et en plein air. Racines peu nombreuses, grosses, ligneuses.

ÉDAPHOSPHERE.

W3 I.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	?	Nombreux	Nombreux	Très nombreuses
10^{-4}	8	21	25	Nombreuses
10^{-5}	0	2	3	95
10^{-6}	0	0	0	17
10^{-7}	0	0	0	2,5
N. A.	65 000	205 000	275 000	21 000 000
Rapports	1 : 323	1 : 102	1 : 76	

HISTOSPHERE.

W3 I.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	Nombreuses	Nombreux	Nombreux	Très nombreuses
10^{-4}	50	15	11	Nombreuses
10^{-5}	8	1	1	200
10^{-6}	1,5	0	0	35
10^{-7}	0	0	0	5
N. A.	650 000	125 000	105 000	42 500 000
Rapports	1 : 65	1 : 340	1 : 404	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect. Actinom. pect. Champignons pect. Microflore totale
 10 — 1,6 — 2,6 2

Vr I ÉDAPHOSPHERE.

Vr I HISTOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques			Microflore totale			Bactéries pectinolytiques			Microflore totale		
10 ⁻²	P	P	P	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	P	P	P	+	+	+	P	P	P	+	+	+
10 ⁻⁴	P	P	P	+	+	+	P	—	—	+	+	+
10 ⁻⁵	P	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	+	+	+	P	—	—	+	+	+
10 ⁻⁷	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+
10 ⁻⁸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	90 000			50 000 000			15 000			50 000 000		
Rapports	1 : 555						1 : 3 333					

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : — 6

Microflore totale : 1.

Les Bactéries pectinolytiques aérobies de l'édaphosphère ressemblent qualitativement à celles d'une terre de jardin (p. 81) avec ses *Empedobacter pectinovorum* et *aquatile*, *B. subtilis* et *E. circulans*. Quantitativement, on voit déjà une nette stimulation par la proximité de la rhizosphère.

Nous avons une autre image dans l'histosphère : les pectinolytiques aérobies y sont 10 fois plus nombreux que dans l'édaphosphère et n'appartiennent plus qu'à une seule espèce : *Empedobacter pectinovorum*. Nous avons donc une stimulation quantitative nette en même temps qu'une action sur la qualité de ces germes. De plus, cette action semble préférentielle car les Bactéries pectinolytiques aérobies sont davantage stimulées (coefficient 10) que les Bactéries de la microflore totale non pectinolytique (coefficient 2).

Parmi les Actinomycètes et les Champignons, en bon nombre dans les 2 échantillons, nous remarquons une légère inhibition par les racines.

Il en va de même chez les anaérobies : *Cl. polymyxa* semble ici

inhibé par l'histosphère. Dans l'édaphosphère, il se trouve en nombre voisin des terres de jardin.

Les anaérobies (facultatifs et stricts) non pectinolytiques sont fortement stimulés par la rhizosphère mais non par l'histosphère en particulier.

II. — LIN DU MAROC

Lin à fleurs bleues, haut de 25 à 30 cm, en pot depuis 5 mois. Nombreuses racines et radicelles tapissant la paroi du pot.

ÉDAPHOSPHERE.

W3 II.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	11	55	0	Nombreuses
10 ⁻⁵	1	3	0	115
10 ⁻⁶	0,5	0,5	0	12,5
10 ⁻⁷	0	0	0	2,5
N. A.	105 000	425 000	Moins de 10 000	18 750 000
Rapports	1 : 178	1 : 44		

HISTOSPHERE.

W3 II.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	56	Nombreux	0	Très nombreuses
10 ⁻⁵	8	62	0	Nombreuses
10 ⁻⁶	0,5	6	0	250
10 ⁻⁷	0	1,5	0	35
10 ⁻⁸	0	0	0	5
N. A.	680 000	6 100 000	Moins de 10 000	425 000 000
Rapports	1 : 625	1 : 69		

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect.	Actinom. pect.	Champignons pect.	Microflore totale
6,4	14,3	—	22,6

Vr II ÉDAPHOSPHERE.

Vr II HISTOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques			Microflore totale		
10^{-3}	P	P	P	+	+	+
10^{-4}	P	P	—	+	+	+
10^{-5}	P	—	—	+	+	+
10^{-6}	+	—	—	+	+	+
10^{-7}	+	—	—	+	—	—
10^{-8}	—	—	—	—	—	—
N. A.	150 000			9 000 000		
Rapports	1 : 60					

Bactéries pectinolytiques			Microflore totale		
P	P	P	+	+	+
P	P	P	+	+	+
P	+	—	+	+	+
+	—	—	+	+	+
—	—	—	+	+	—
—	—	—	—	—	—
300 000			19 000 000		
1 : 63					

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : 2.

Microflore totale : 2,1.

Les Bactéries pectinolytiques aérobies nous donnent du point de vue qualitatif, les mêmes résultats pour ce lin que pour le *Pelargonium* : microflore mixte dans l'édaphosphère (*Empedobacter*, *Bacillus*), microflore uniforme à base d'*E. pectinovorum* dans l'histosphère, l'histosphère exerce là aussi une action nettement stimulatrice sur ce germe, puisque le coefficient rhizosphère est de 6. Mais pour ce lin, les Bactéries de la microflore totale non pectinolytiques sont bien plus fortement stimulées par l'histosphère que *E. pectinovorum* (coefficient 22).

Contrairement au *Pelargonium*, les Actinomycètes sont fortement activés par l'histosphère du lin (coefficient 14). Les Champignons pectinolytiques se trouvent en quantités négligeables aussi bien dans le rhizoplan que dans l'édaphosphère.

Parmi les anaérobies, nous constatons une légère stimulation de *Cl. polymyxa* et des anaérobies non pectinolytiques par l'histosphère (coefficient 2).

III. — VESCE D'HIVER

Vicia sativa hyemalis.

Vesce plantée en pot en février. En fleurs en juin. Chevelu de racines, tapissant le pot.

ÉDAPHOSPHERE.

W3 III.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	Nombreuses	?	?	Innombrables
10 ⁻⁴	9	10	0	Très nombreuses
10 ⁻⁵	1,5	6	0	Nombreuses
10 ⁻⁶	0	0	0	51
10 ⁻⁷	0	0	0	8
N. A.	120 000	350 000	Moins de 10 000	65 500 000
Rapports	1 : 554	1 : 190	—	

HISTOSPHERE.

W3 III.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	Nombreuses	?	?	Innombrables
10 ⁻⁵	16	5	0	Très nombreuses
10 ⁻⁶	2	0,5	0	Nombreuses
10 ⁻⁷	0,5	0	0	110
10 ⁻⁸	0	0	0	15
N. A.	1 800 000	400 000	Moins de 100 000	1 300 000 000
Rapports	1 : 722	1 : 3 250		

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect. Actinom. pect. Champignons pect. Microflore totale
 15 Env. 1,1 — 19

Vr III ÉDAPHOSPHERE.

Vr III HISTOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques			Microflore totale		
10^{-3}	P	P	P	+	+	+
10^{-4}	P	P	P	+	+	+
10^{-5}	+	+	—	+	+	+
10^{-6}	—	—	—	+	+	—
10^{-7}	—	—	—	+	—	—
10^{-8}	—	—	—	—	—	—
N. A.	190 000			3 000 000		
Rapports	1 : 15					

Bactéries pectinolytiques			Microflore totale		
P	P	P	+	+	+
P	P	P	+	+	+
+	+	—	+	+	+
—	—	—	+	+	—
—	—	—	+	—	—
—	—	—	—	—	—
190 000			3 000 000		
1 : 15					

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : 1.

Microflore totale : 1.

Empedobacter pectinovorum est seul présent, aussi bien dans l'éda-phosphère que dans l'histosphère. Ici encore, ce germe est fortement stimulé au contact des racines (coefficient 15). Les Bactéries aérobies non pectinolytiques dont le nombre est très élevé dans l'histosphère ont un coefficient dans le même ordre de grandeur que les Bactéries pectinolytiques.

Les Actinomycètes ne sont pratiquement pas stimulés et l'on peut même parler d'une inhibition notable si l'on considère que ces organismes n'ont pas réagi à l'augmentation de l'ensemble des microorganismes.

Il en va de même pour les Bactéries anaérobies non pectinolytiques et pour *Clostridium polymyxa* qui représente dans ce cas les anaérobies pectinolytiques.

Les Champignons sont eux pratiquement absents de cet échantillon.

IV. — KOCHIA TRICHOPHYLLA (STAPF)

(Chénopodiacee).

Kochia en fleurs, d'une hauteur de 50 cm, planté en pleine terre de jardin (A2). Nombreuses radicelles (semé au printemps, prélèvement effectué en automne de la même année).

ÉDAPHOSPHERE.

W3 IV.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	Nombreuses	Nombreux	?	Très nombreuses
10 ⁻⁴	13	12	0	Nombreuses
10 ⁻⁵	2	2	0,5	102
10 ⁻⁶	0,5	0,5	0	24
10 ⁻⁷	0	0	0	4
N. A.	165 000	160 000	Moins de 1 000	32 000 000
Rapports	1 : 193	1 : 200	—	

HISTOSPHERE.

W3 IV.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	Nombreuses	Nombreux	0	Innombrables
10 ⁻⁵	20	50	0	Très nombreuses
10 ⁻⁶	4	10	0	Env. 420
10 ⁻⁷	0,5	2	0	63
10 ⁻⁸	0	0	0	9
N. A.	3 000 000	15 000 000	Moins de 10 000	765 000 000
Rapports	1 : 255	1 : 51	—	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect.	Actinom. pect.	Champignons pect.	Microflore totale
18	94	—	24

Vr IV ÉDAPHOSPHERE.

Vr IV HISTOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques			Microflore totale		
10 ⁻²	P	P	P	+	+	+
10 ⁻³	P	P	P	+	+	+
10 ⁻⁴	P	P	P	+	+	+
10 ⁻⁵	P	—	—	+	+	+
10 ⁻⁶	—	—	—	+	+	+
10 ⁻⁷	—	—	—	—	—	—
N. A.	90 000			5 000 000		
Rapports	1 : 55			—		

Bactéries pectinolytiques			Microflore totale		
P	P	P	+	+	+
P	P	P	+	+	+
P	P	—	+	+	+
—	—	—	+	+	+
P	—	—	+	+	+
—	—	—	—	+	—
30 000			19 000 000		
1 : 633					

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : — 3.

Microflore totale : 3,8.

Les Actinomycètes subissent ici une activation puissante. Le coefficient rhizosphère est en effet extrêmement élevé (94). La qualité des Bactéries pectinolytiques aérobies de l'histosphère ressemble à celle de l'édaphosphère, mais *E. pectinovorum* s'y trouve à une fréquence beaucoup plus élevée. Nous avons donc à nouveau une stimulation préférentielle de ce germe par le rhizoplan.

Les autres pectinolytiques aérobies isolés de l'histosphère ont été déterminés comme *Empedobacter viride* et *Empedobacter balustinum*, germe très peu pectinolytique.

Enfin, quelques godets contenaient des colonies non pigmentées appartenant à *E. circulans* et *B. subtilis*, Bactéries qui, rappelons-le, se trouvent dans les terres de jardin. *Clostridium polymyxa* est légèrement inhibé par l'histosphère alors que les Bactéries anaérobies non pectinolytiques semblent stimulées.

Les Champignons se trouvent en trop petit nombre pour qu'on puisse évaluer leur sensibilité vis-à-vis des racines.

V. — ATRIPLEX PATULA (L.)

(Chénopodiacee).

Plante annuelle, haute de 50 cm à 1 m, récoltée en automne. Lors du prélèvement, la plante est en graines et commence à se faner (culture spontanée en pleine terre à blé, près de Villacoublay).

ÉDAPHOSPHERE.

W3 V.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	?	Nombreux	?	Très nombreuses
10^{-4}	3	20	5	Nombreuses
10^{-5}	0	4	0	80
10^{-6}	0	0,5	0	18
10^{-7}	0	0	0	3
N. A.	30 000	300 000	50 000	24 000 000
Rapports	1 : 800	1 : 80	1 : 480	

HISTOSPHERE.

W3 V.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-4}	Nombreuses	Nombreux	Nombreux	Très nombreuses
10^{-5}	10	40	6	Nombreuses
10^{-6}	1	5	1	131
10^{-7}	0,5	0,5	0	14
10^{-8}	0	0	0	3
N. A.	1 000 000	4 500 000	800 000	220 000 000
Rapports	1 : 220	1 : 49	1 : 275	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect.	Actinom. pect.	Champignons pect.	Microflore totale
33	15	16	9

Vr V ÉDAPHOSPHERE.

Vr V HISTOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻³	P P +	+ + +	— — —	+ + +
10 ⁻⁴	P P P	+ + +	— — —	+ + +
10 ⁻⁵	+ — —	+ + +	— — —	+ + +
10 ⁻⁶	— — —	— — —	— — —	+ — —
10 ⁻⁷	— — —	— — —	— — —	— — —
N. A.	90 000	500 000	Max. : 500	900 000
Rapports	1 : 5,5	—	1 : 1 800	—

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : — 180.

Microflore totale : 1,8.

Les 4 groupes de microorganismes aérobies étudiés sont tous activés. Les pectinolytiques aérobies le sont même beaucoup (coefficient 33). Parmi ces derniers, *E. pectinovorum* constitue un tiers des godets dans le rhizoplan : il ne se trouve pas dans la terre témoin. Les autres germes sont des Bactéries non chromogènes parmi lesquelles nous avons isolé un *Pseudomonas* déterminé comme *P. schuykillensis*.

Un *Achromobacter mariense* a été isolé tout à fait par hasard en voulant repiquer une colonie d'*Empedobacter*. Quelques autres godets contiennent des sporulés (vraisemblablement du groupe *circulans*) que nous n'avons pu isoler.

Parmi toutes les boîtes, un seul godet renferme une Myxobactériale. *Clostridium polymyxa* qui se trouve en grand nombre dans la terre témoin ne réapparaît pas dans le rhizoplan. Cette plante exerce sur ce germe une inhibition certaine : les Bactéries anaérobies non pectinolytiques sont par contre légèrement stimulées.

VI. — SOLANUM NIGRUM (L.)

(Solanacée).

Plante annuelle, étalée, de 50 cm à 1 m de diamètre. Croît spontanément en pleine terre à blé (Villacoublay C1) avec *A. patula*. Récoltée en automne : plante avec fleurs et fruits en pleine maturité. Racines abondantes de toute tailles. Comme terre témoin, nous avons pris la même que pour *A. patula*.

HISTOSPHERE.

W3 VI.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	Nombreuses	Nombreux	Nombreux	Très nombreuses
10 ⁻⁵	25	40	10	Nombreuses
10 ⁻⁶	6	5	0	180
10 ⁻⁷	0	0,5	0	23
10 ⁻⁸	0	0	0	3,5
N. A.	4 250 000	4 500 000	1 000 000	290 000 000
Rapports	1 : 68	1 : 64	1 : 290	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect. Actinom. pect. Champignons pect. Microflore totale
141 15 20 12

Vr VI HISTOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻³	—	+
10 ⁻⁴	P	+
10 ⁻⁵	+	+
10 ⁻⁶	+	+
10 ⁻⁷	+	+
N. A.	Maximum : 1 300	700 000
Rapport	1 : 538	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : — 69.

Microflore totale : 1,4.

C'est aussi un *Empedobacter* qui pullule sur les racines de *S. nigrum*. Il se distingue d'emblée de *E. pectinovorum* par ses grosses colonies rondes, jaune pâle, à godets peu marqués. Ces bâtonnets trapus appartiennent à l'espèce nouvelle *E. radicum* que nous avons rencontrée ici et là dans différents échantillons de boue et de terreau. Cette Bactérie constitue environ 90 % des godets et est spécifiquement stimulée par les racines (141 fois). Nous ne l'avons pas rencontrée dans la terre témoin.

Les autres godets contiennent des germes non pigmentés, appartenant à *P. schuykillensis*, germe fréquent dans les terres de grande culture.

Cl. polymyxa subit une forte inhibition par les racines. Les germes anaérobies non pectinolytiques ne sont pratiquement pas stimulés.

Actinomycètes et Champignons pectinolytiques subissent une activation égale à celle des Bactéries non pectinolytiques aérobies.

VII. — SALVIA SPLENDENS (KER)

Sauge à fleurs rouges, plantée sur couche de terreau et de sable ; 0,4 g de terre du rhizoplan sont récoltés par centrifugation, puis dilués dans 9 cm³ d'eau distillée.

ÉDAPHOSPHERE.

W3 VII.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	?	Nombreux	?	Très nombreuses
10 ⁻⁴	3	11	12	Nombreuses
10 ⁻⁵	0	2,5	2	110
10 ⁻⁶	0	1	0	20
10 ⁻⁷	0	0	0	3,5
N. A.	75 000	450 000	400 000	68 750 000
Rapports	1 : 916	1 : 152	1 : 171	

Le coefficient rhizosphère des Bactéries pectinolytiques aérobies est à nouveau très élevé (85) pour cette plante. Nous y retrouvons le classique *E. pectinovorum*. Les Bactéries aérobies non pectinolytiques sont stimulées mais le coefficient est beaucoup plus faible (10), ce qui nous fait penser à nouveau que *E. pectinovorum* tire davantage parti des sécrétions radiculaires. Ce germe est ici représenté dans tous les godets de la pectinolyse. La liquéfaction des plaques qu'il provoque rapidement n'a pas rendu possible le dénombrement des Actinomycètes et des Champignons pectinolytiques. Ce même genre est également seul présent dans l'édaphosphère.

Clostridium polymyxa ainsi que les anaérobies non pectinolytiques semblent indifférents à la présence des racines de *S. splendens*.

VIII. — COLEUS (HYBRIDE)

(Labiées).

Plante de 70 cm de hauteur, en pot depuis 1 an, dans un mélange de terreau et de terre à blé. Cultivée en serre. Nombreuses racines tapissant la paroi du pot.

ÉDAPHOPHÈRE.

W3 VIII.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	Nombreuses	Nombreux	Nombreux	Innombrables
10 ⁻⁴	20	25	15	Très nombreuses
10 ⁻⁵	3	3,5	2	Nombreuses
10 ⁻⁶	0,5	1	0,5	36
10 ⁻⁷	0	0	0	5
N. A.	250 000	300 000	175 000	43 000 000
Rapports	1 : 172	1 : 143	1 : 245	—

HISTOSPHERE.

W3 VIII.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	Nombreuses	Nombreux	Nombreux	Innombrables
10 ⁻⁴	21	25	15	Très nombreuses
10 ⁻⁵	4	3	2	Nombreuses
10 ⁻⁶	0	1	1	83
10 ⁻⁷	0	0	0	10
N. A.	305 000	300 000	175 000	91 500 000
Rapports	1 : 300	1 : 305	1 : 523	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect.	Actinom. pect.	Champignons pect.	Microflore totale
1,2	1	1	2,1

Vr VIII ÉDAPHOSPHERE.

Vr VIII HISTOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10 ⁻²	P P P	+ + +
10 ⁻³	P P P	+ + +
10 ⁻⁴	P — —	+ + +
10 ⁻⁵	— — —	+ + +
10 ⁻⁶	P — —	+ + +
10 ⁻⁷	— — —	— — —
N. A.	15 000	9 000 000
Rapports	1 : 600	

Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
P P P	+ + +
P P P	+ + +
P P P	+ + +
— — —	+ + +
— — —	+ + +
— — —	— — —
50 000	9 000 000
1 : 180	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : 3.3.

Microflore totale : 1.

Nous avons ici une image fort différente des cas précédents tant qualitativement que quantitativement. Les coefficients de stimulation sont faibles dans tous les groupes de microorganismes étudiés. Les racines sont donc peu actives vis-à-vis des microorganismes.

Quant aux Bactéries aérobies pectinolytiques, nous avons trouvé *Bacillus subtilis* pratiquement à l'état pur, aussi bien dans l'édaphosphère que dans l'histosphère, l'action de cette dernière étant nulle ou presque sur ce germe. Les Actinomycètes et les Champignons pectinolytiques sont présents mais indifférents aux sécrétions radiculaires de cette plante.

Clostridium polymyxa toujours présent, semble légèrement activé alors que les anaérobies non pectinolytiques ne le sont pas du tout.

IX. — MAIS HYBRIDE N° 1

Maïs en fleurs, cultivé en pleine terre. Terre à blé type C₁. Semé en mars, récolté en juillet, terre très sèche.

ÉDAPHOSPHÈRE.

W3 IX.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻³	Nombreuses	Nombreux	Nombreux	Innombrables
10 ⁻⁴	17	38	15	Très nombreuses
10 ⁻⁵	2	5	3	Env. 250
10 ⁻⁶	0	2	0	43
10 ⁻⁷	0	0	0	6
N. A.	185 000	960 000	225 000	51 500 000
Rapports	1 : 278	1 : 53	1 : 229	

HISTOSPHERE.

W3 IX.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	25	Nombreux	26	Très nombreuses
10 ⁻⁵	3	34	5	Nombreuses
10 ⁻⁶	0	3,5	0,5	122
10 ⁻⁷	0	0	0	15
10 ⁻⁸	0	0	0	2
N. A.	275 000	3 450 000	380 000	175 000 000
Rapports	1 : 636	1 : 50	1 : 460	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect.	Actinom. pect.	Champignons pect.	Microflore totale
1,5	3,5	1,7	3,4

Vr IX EDAPHOSPHERE.

Vr IX HISTOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques			Microflore totale
10 ⁻²	+	+	+	+
10 ⁻³	P	P	P	+
10 ⁻⁴	P	—	—	+
10 ⁻⁵	P	—	—	+
10 ⁻⁶	—	—	—	+
10 ⁻⁷	—	—	—	+
N. A.	15 000			800 000
Rapports	1 : 53			

Bactéries pectinolytiques			Microflore totale
+	+	+	+
P	P	P	+
P	P	—	+
P	—	—	+
—	—	—	+
—	—	—	—
45 000			900 000
1 : 20			

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : 3.
Microflore totale : 1,1.

X. — MAIS HYBRIDE N° 2

Maïs cultivé en pot, semé au mois de février, récolté en fleurs au mois de juillet. Nombreuses racines tapissant le pot. Terre de culture : mélange de terreau et de terre à blé.

ÉDAPHOSPHERE.

W3 X.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	?	Nombreux	?	Très nombreuses
10^{-4}	4	15	0	Nombreuses
10^{-5}	0,5	2,5	0	150
10^{-6}	0	0	0	10
N. A.	40 000	200 000	Moins de 1 000	12 500 000
Rapports	1 : 312	1 : 62		

HISTOSPHERE.

W3 X.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-4}	11	50	?	Très nombreuses
10^{-5}	1,5	6	0,5	Nombreuses
10^{-6}	0	3	0	107
10^{-7}	0	0,5	0	8
N. A.	130 000	1 360 000	?	93 500 000
Rapports	1 : 719	1 : 68		

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect.	Actinom. pect.	Champignons pect.	Microflore totale
3,2	6,8	3	7,4

Les tubes ayant été jetés par mégarde, il nous est impossible de relater ici les résultats concernant les anaérobies.

Les deux plantes de maïs étudiées donnent des résultats similaires, bien qu'élevées dans des conditions très différentes. Dans l'ensemble, les coefficients rhizosphère sont faibles. Les germes non pectinolytiques aérobies sont moyennement stimulés (3,4 et 7,4 fois) ; il en est de même pour les Actinomycètes avec des coefficients très voisins. Les Bactéries aérobies pectinolytiques le sont beaucoup moins (1,5 et 3,2 fois) et les germes que l'on rencontre dans l'édaphosphère et l'histosphère sont aussi présents dans les terres de grande culture loin des racines : il s'agit ici de *P. schuyllkilliensis*. Les *Empedobacter* sont absents dans les deux plants étudiés.

Clostridium polymyxa est légèrement activé. Les anaérobies non pectinolytiques ne l'étant pas du tout. Quant aux Champignons, il ne nous est pas possible de nous prononcer.

XI. — BLÉ

Blé en fleurs, planté en pot (terre-terreau) en février, récolté en juin. Nombreuses radicelles tapissant la paroi du pot.

ÉDAPHOSPHERE.

W3 XI.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	?	Nombreux	Envahissement	Très nombreuses
10^{-4}	5	20	5	Nombreuses
10^{-5}	1	2,5	0,5	245
10^{-6}	0	1	0	36
10^{-7}	0	0	0	4,5
N. A.	50 000	225 000	50 000	40 500 000
Rapports	1 : 810	1 : 180	1 : 810	

HISTOSPHERE.

W3 XI.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-4}	Nombreuses	Nombreux	Nombreux	Très nombreuses
10^{-5}	8	13	13	Nombreuses
10^{-6}	0,5	4	2	225
10^{-7}	0	0,5	2	22
10^{-8}	0	0	0	3
N. A.	800 000	2 650 000	1 650 000	260 000 000
Rapports	1 : 325	1 : 98	1 : 157	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect.	Actinom. pect.	Champignons pect.	Microflore totale
16	11,8	33	6,4

Vr XI ÉDAPHOSPHERE.

Vr XI HISTOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques			Microflore totale	Bactéries pectinolytiques			Microflore totale
10^{-3}	P	P	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	P	P	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	P	—	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-7}	—	—	—	—	—	—	—	—
N. A.	600 000 ?			5 000 000	1 900 000 ?			5 000 000
Rapports								

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : 2 (3).

Microflore totale : 1.

Les Bactéries pectinolytiques aérobies de l'édaphosphère sont représentées par une microflore mixte habituelle des terres de jardin (p. 81) avec ses *Empedobacter*, *Bacillus* et *Pseudomonas*. Dans l'histosphère au contraire, *E. pectinovorum* existe pratiquement seul avec un coefficient de 16. Les Bactéries aérobies non pectinolytiques ne donnent qu'un coefficient de 6 à 7. *E. pectinovorum* est donc stimulé d'une manière plus spécifique par les racines. Il en est de même et d'une manière encore plus accentuée pour les Champignons. Les Actinomycètes sont fortement activés. Parmi les Bactéries anaérobies, *Cl. polymyxa* ainsi qu'un sporulé non gazogène du type *E. circulans* (non isolé) assurent la pectinolyse, mais il est difficile ici de calculer un chiffre précis de leur nombre en raison de l'irrégularité de l'attaque. Les anaérobies non pectinolytiques restent indifférents aux sécrétions radiculaires.

XII. — SEIGLE

Seigle en fleurs, planté en pot (mélange terre-terreau) en février, récolté en juillet. De nombreuses radicelles tapissent la paroi du pot.

ÉDAPHOSPHERE.

W3 XII.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-3}	?	Nombreux	?	Très nombreuses
10^{-4}	11	31	3	Nombreuses
10^{-5}	2	3,5	0,5	133
10^{-6}	0	0	0	9
N. A.	155 000	330 000	30 000	11 150 000
Rapports	1 : 71	1 : 33	1 : 371	

HISTOSPHERE.

W3 XII.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10^{-4}	15	Nombreux	?	Très nombreuses
10^{-5}	2	48	o	Nombreuses
10^{-6}	o	3	o	87
10^{-7}	o	0,5	o	9
N. A.	175 000	3 900 000	?	88 500 000
Rapports	1 : 505	1 : 22	?	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect. Actinom. pect. Champignons pect. Microflore totale
 1,1 11,8 p 7,9

Vr XII ÉDAPHOSPHERE.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
10^{-3}	P P +	+ + +
10^{-4}	P P P	+ + +
10^{-5}	— — —	+ + +
10^{-6}	+ — —	+ + —
10^{-7}	— — —	— — —
N. A.	80 000	1 900 000
Rapports	1 : 24	

Vr XII HISTOSPHERE.

Bactéries pectinolytiques	Microflore totale
P P +	+ + +
P P +	+ + +
P + —	+ + +
P P —	+ + +
+ — —	+ — —
600 000	9 000 000
1 : 15	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : 7,5.

Microflore totale : 4,7.

Les *Empedobacter* font défaut aussi bien dans l'édaphosphère que dans l'histosphère. Ils sont remplacés par *B. subtilis* qui est très peu sensible à la proximité des racines (1,1).

Les Actinomycètes et les Bactéries non pectinolytiques aérobies profitent eux, avantageusement de ce voisinage. Il est donc probable que les *Empedobacter* subissent une véritable inhibition venant de cette plante.

Clostridium polymyxa, ainsi que les anaérobies non pectinolytiques nous apparaissent pour la première fois nettement stimulés par les racines du seigle.

CONCLUSIONS

Cette étude nous donne des résultats forts intéressants. Cependant, il apparaît d'emblée qu'aucune loi générale ne peut être énoncée, chaque plante agissant à sa manière sur le monde des microorganismes qui entoure ses racines ; autant de plantes différentes, autant de cas. Telle est bien la loi première. Toutefois, certains groupes de pectinolytiques semblent être activés davantage et reviennent plus souvent dans la liste des espèces citées. C'est ce que nous montre le tableau suivant (n° VI) dans lequel nous reportons pour chaque groupe de pectinolytiques la moyenne des coefficients rhizosphère, ainsi que le coefficient maximum et minimum.

TABEAU VI

	Coefficients rhizosphère			Nombre de résultats obtenus sur 12 cas
	Maximum	Minimum	Moyenne	
Bactéries pectinolytiques aérobies	141	1,1	27,6	12
Actinomycètes pectinolytiques	94	— 1,6	15,7	11
Champignons pectinolytiques	33	— 2,6	11,5	6
Microflore totale aérobie	24	— 2,1	10,5	12
Anaérobies pectinolytiques	7,5	— 180	— 24,0	10
Microflore totale anaérobie	4,7	1,0	1,8	11

Parmi les anaérobies pectinolytiques, nous avons une moyenne négative du coefficient rhizosphère. Nous nous garderons bien de dire que ces germes (le plus souvent *Cl. polymyxa*) ne profitent pas de la proximité des racines. Dans 4 des cas étudiés le coefficient rhizosphère varie

de 2 à 7,5, la stimulation est donc évidente. Mais dans l'ensemble, la rhizosphère active beaucoup moins la croissance de ces germes que celle des autres groupes.

Dans 2 des cas, le coefficient est égal à 1 ; les 4 autres plantes inhibent nettement, voire même fortement la multiplication de ce groupe.

Les anaérobies non pectinolytiques se comportent de la même manière. Les germes sont indifférents aux sécrétions radiculaire dans 6 cas sur 11, les 5 autres plantes ne stimulant que très moyennement ou à peine ce groupe.

Il en est tout autrement dans le camp des aérobies. Ils donnent dans l'ensemble des coefficients rhizosphère positifs et même très élevés. La microflore totale non pectinolytique est activée dans 12 cas sur 12 par les racines. Le coefficient moyen étant ici de 10, ce chiffre concorde avec les données classiques des divers auteurs (voir Pochon (120)).

La plupart des plantes étudiées stimulent les Actinomycètes et les Champignons, exception faite du *Pelargonium* qui inhibe, bien que faiblement, la croissance de ces deux groupes et du *Coleus* dont les racines n'ont aucun effet sur ces germes aussi bien que sur les autres groupes. Les Actinomycètes sont également indifférents à la proximité des racines de la *Vesce*. Au contraire, le *Kochia* nous donne un coefficient très élevé (94) pour les Actinomycètes. Dans ce cas particulier, ceux-ci sont donc stimulés 4 à 5 fois plus que les autres groupes de microorganismes aérobies.

Nous arrivons aux Bactéries aérobies pectinolytiques qui, de loin, donnent les résultats les plus intéressants. En général, la présence des racines est favorable au développement de ces germes. Le tableau VI nous indique bien que c'est le groupe qui possède le coefficient moyen le plus élevé. Cependant, le *Coleus* et le seigle se montrent inactifs. Dans la rhizosphère de ces deux plantes, nous isolons *B. subtilis* en grand nombre, à l'exception de toute autre Bactérie pectinolytique aérobie. Toutefois, ce sporulé reste indifférent ou presque aux sécrétions radiculaire (coefficient 1,1 et 1,2).

Le maïs ne donne que des coefficients moyens pour tous les groupes pectinolytiques. La qualité des Bactéries aérobies pectinolytiques de l'éda-phosphère ne change pas dans l'histosphère ; ce sont les mêmes germes qui sont stimulés de 2 à 3 fois.

Le résultat le plus marquant de cette étude reste l'abondance des *Empedobacter*, autour des racines de 8 des plantes étudiées. Il s'agit du groupe *E. pectinovorum-aquatilis* dans 7 de ces plantes et d'*E. radicum* dans une plante seulement (*S. nigrum*).

De 6 des plantes étudiées, on ne retrouve dans l'histosphère que des *Empedobacter* à l'exclusion de toute autre Bactérie pectinolytique aérobie ; dans 2 cas, les *Empedobacter*, en grand nombre, sont mélangés avec d'autres Bactéries pectinolytiques. Il apparaît donc que ces germes sont souvent stimulés beaucoup plus que d'autres pectinolytiques. L'influence des racines peut même être si forte sur ces microorganismes qu'on les retrouve également dans l'édaphosphère comme seules Bactéries aérobies pectinolytiques (sauge, vesce).

Nous voyons de même que, pour 5 des plantes à *Empedobacter*, le coefficient rhizosphère de ces Bactéries est beaucoup plus élevé que celui des Bactéries de la microflore totale aérobie. Dans *S. nigrum*, l'exemple le plus marquant, le coefficient rhizosphère des *Empedobacter* est près de 12 fois plus grand que celui des autres Bactéries aérobies. Avec cette plante, nous atteignons d'ailleurs le coefficient record de 141. Nous pouvons donc affirmer que, dans de nombreux cas, les *Empedobacter* sont non seulement favorisés par rapport aux autres Bactéries pectinolytiques, mais aussi par rapport à l'ensemble des Bactéries, voire même de tous les microorganismes. Les *Empedobacter* sont stimulés d'une manière plus spécifique par les racines de ces plantes.

Ces faits devaient nous conduire à chercher le rôle de ces germes autour des racines. Avec les méthodes de cultures hydroponiques des plantes, nous avons essayé de voir si les *Empedobacter* avaient une action précise sur les racines au point de vue pectinolyse.

Nous avons adopté la technique simple et pratique de M.-A. Chalvignac (24) dont voici la description sommaire : les graines de lin et de blé sont stérilisées en surface par immersion dans une solution de chlorure mercurique à 1 ‰ pendant 1/4 d'heure. On rince 8 fois à l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite transportées stérilement dans des tubes de culture appropriés (fig. 12). Chaque tube reçoit 4 graines qui reposent sur une mince couche de laine de verre. Celle-ci adhère facilement aux parois du tube et affleure le milieu de culture

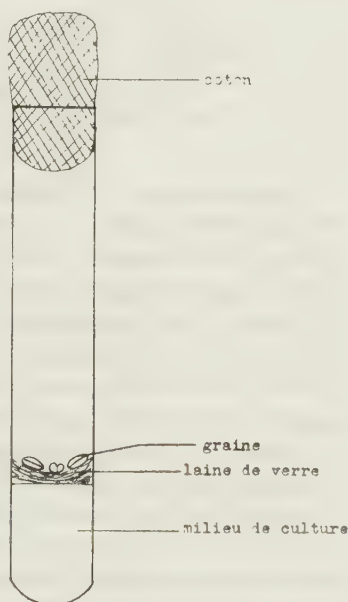


FIG. 12. — Culture en milieu hydroponique.

qui est réparti à raison de 30 cm³ par tube (stérilisation : 1/2 heure à 110° C). La composition en est la suivante :

Ca(NO ₃) ₂	0,5	g
KNO ₃	0,2	»
KH ₂ PO ₄	0,2	»
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,25	»
SO ₄ Fe	0,04	»
Cl ₂ Mn, 4 H ₂ O	0,005	»
BO ₃ H ₃	0,002	»
Solution d'oligoéléments	1	‰
Eau distillée q. s. p. 1 000		

L'ensemencement des graines terminé, on répartit 1 cm³ (par tube) de suspension de terre à la dilution 10⁻³ dans une partie des tubes. La terre est un mélange de terres de jardin contenant des *Empedobacter*.

Une deuxième partie des tubes reçoit des Bactéries pectinolytiques en culture pure. Les cultures bactériennes sont fortement diluées dans l'eau distillée pour qu'elles n'apportent aucune pectine ni aucune enzyme pectinolytique dans les nouveaux milieux.

Dans une troisième partie des milieux contenant des graines tuées par la chaleur, on met, d'une part, les dilutions de terre et, d'autre part, les cultures pures. Ces tubes servent donc de témoins.

Enfin, dans les dernier tubes, il ne pousse que des plantules sans autre addition, de manière à pouvoir extraire d'éventuelles substances pectiques sécrétées par les racines.

Les graines de lin, la première plante étudiée, germent dès le lendemain de l'ensemencement. Au bout de 2 semaines, les plantules atteignent le coton et paraissent en bonne santé. Une semaine plus tard, les tubes sont ouverts pour l'analyse des résultats. Les plantes ont été cultivées à la température du laboratoire (22°-25° C) et à la lumière du jour. Elles n'ont pas de fleurs. Le blé pousse bien de cette façon toute l'année, alors que le lin ne donne de bons résultats qu'entre les mois de mai à juillet.

Dans les tubes contenant des germes pectinolytiques en culture pure, nous avons recherché la présence d'éventuels enzymes de la pectinolyse. Dans ce but, 1 cm³ de culture est mélangé aux substrats enzymatiques habituels (4^e partie, chapitre premier). Une baisse de viscosité du substrat traduit la présence d'une enzyme. Nous reportons, en secondes, la durée d'écoulement du substrat enzymatique sur un viscosimètre. Plus la durée d'écoulement est rapide, plus l'enzyme se trouve en grande quantité dans l'échantillon (tableau VII).

TABLEAU VII

	Culture avec plante normale	Culture avec graines tuées
<i>Empedobacter pectinovorum</i> , souche RsG de la rhizosphère du Pélargonium	5,0 sec	12,0 sec
<i>Empedobacter aquatilis</i> , souche Tj d'une terre de jardin	6,0 »	14,0 »
<i>Empedobacter radicum</i> , souche RsSN de la rhizosphère de <i>Solanum nigrum</i>	6,5 »	12,0 »
<i>Pseudomonas schuytkillensis</i> , souche RsM de la rhizosphère du maïs	6,0 »	5,0 »

Liquide de culture du lin sans Bactérie 600 secondes
 Liquide de culture des graines tuées sans Bactéries.. 300 »

Nous voyons donc que ces quelques Bactéries pectinolytiques sécrètent de grandes quantités d'enzymes pectinolytiques, en présence des racines du lin, la sécrétion d'enzymes des *Empedobacter* est plus importante au contact des racines qu'avec des graines mortes.

Ceci pourrait nous faire penser que la plante diffuse des substances pectiques dans le milieu. Par précipitation alcoolique, nous avons essayé, mais sans succès, d'extraire des substances pectiques, dans le liquide de culture des plantules de lin (non ensemencées avec les Bactéries). Il s'est formé un précipité floconneux blanc qui n'était pas de la pectine (dosage selon Kertesz comme pectate de calcium). Ainsi nous ne savons pas quel est le rôle éventuel de ces enzymes pectinolytiques dans la rhizosphère.

Les plantules de blé, cultivées dans les mêmes conditions, ont donné des résultats similaires (tableau VIII).

TABLEAU VIII

	Culture avec plante normale	Culture avec graines tuées
<i>Empedobacter pectinovorum</i> RsG	7 sec	300 sec
<i>Empedobacter aquatilis</i> , souche TTA de la terre de jardin	300 »	300 »
<i>Empedobacter radicum</i> , souche RsSN	300 »	300 »
<i>Pseudomonas schuytkillensis</i> RsM	300 »	300 »
<i>Cl. polymyxa</i>	7 »	300 »

Pour cette plante, seuls *E. pectinovorum* et *Cl. polymyxa* sécrètent des enzymes en abondance et uniquement en présence des racines. Les autres Bactéries ne produisent aucune enzyme dans le liquide de culture. Là encore, nous avons tenté d'extraire de la pectine des milieux de culture des plantes. Le précipité blanc obtenu n'était pas de la pectine (dosage comme pectate de Ca, Kertesz).

L'ensemencement, sur les milieux W3 et Vr, de 1 cm³ de liquide ayant reçu la dilution de terre a donné les résultats suivants :

A. — *Lin.*

ENSEMENCEMENT SUR MILIEU W3

1) Plante de lin avec dilution de terre.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	20	0	0	Nombreuses
10 ⁻⁵	3	0	0	165
10 ⁻⁶	0	0	0	22
N. A.	250 000	Moins de 10 000	Moins de 10 000	22 000 000
Rapports	1 : 88	—	—	

2) Graines de lin tuées avec dilution de terre.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	20	0	0	Nombreuses
10 ⁻⁵	3,5	0	0	263
10 ⁻⁶	0	0	0	29
N. A.	275 000	Moins de 10 000	Moins de 10 000	29 000 000
Rapport	1 : 105	—	—	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect.	Actinom. pect.	Champignons pect.	Microflore totale
— 1,1	—	—	— 1,3

ENSEMENCEMENT SUR MILIEU Vr

1) Plante + dilution de terre.

Dilutions	Bactéries pectinolytiques
10 ⁻²	P P
10 ⁻³	P P
10 ⁻⁴	P P
10 ⁻⁵	P —
N. A.	60 000

2) Graines tuées + dilution de terre.

Bactéries pectinolytiques	
+	+
+	+
+	+
—	—
25 000	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pectinolytiques : 2,4.

Il fallait s'attendre à des résultats tous différents de ceux trouvés dans le lin cultivé en terre. En effet, ils ont été obtenus avec des plantes âgées de 3 semaines seulement, sans fleur ni graine et cultivées dans des conditions très différentes (milieu liquide).

La moitié des Bactéries pectinolytiques aérobies est constituée par des *Empedobacter* (non isolés). Ces germes étant ici insensibles aux sécrétions radiculaires, *Cl. polymyxa* au contraire s'est multiplié abondamment au contact des racines. C'est un autre germe anaérobie qui se trouve dans le témoin.

B. — Blé.

ENSEMENCEMENT SUR MILIEU W3

1) Plante de blé avec dilution de terre.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	15	—	—	Très nombreuses
10 ⁻⁵	0	—	—	Nombreuses
10 ⁻⁶	0	—	—	46
10 ⁻⁷	0	—	—	5
10 ⁻⁸	0	—	—	1,5
N. A.	150 000	Moins de 10 000	Moins de 10 000	48 000 000
Rapport	1 : 320	—	—	

2) Graines de blé tuées avec dilution de terre.

Dilutions	Bactéries	Actinomycètes pectinolytiques	Champignons	Microflore totale
10 ⁻⁴	3	—	4	Nombreuses
10 ⁻⁵	1	—	0,5	69
10 ⁻⁶	0	—	0	8,5
10 ⁻⁷	0	—	0	1,5
10 ⁻⁸	0	—	0	1
N. A.	30 000	Moins de 10 000	40 000	7 700 000
Rapports	1 : 256	—	1 : 192	

COEFFICIENTS RHIZOSPHERE :

Bactéries pect.	Actinom. pect.	Champignons pect.	Microflore totale
5	—	négatif	6,2

Anaérobies : les milieux Vr n'ont donné aucune culture.

Ces données correspondent mieux à celles obtenues par des plantes en terre. Les coefficients rhizosphère sont positifs pour les Bactéries aérobies. Cependant, les *Empedobacter*, qui forment la moitié des godets dans les tubes témoin, contenant des graines tuées, ne réapparaissent pas autour des racines des plantules de blé. D'autres Bactéries, dont nous ne connaissons pas la nature, ont pris leur place.

Les résultats obtenus par la méthode de culture hydroponique ne sont donc qu'en partie satisfaisants. Les divergences entre les chiffres de la culture hydroponique des plantes et ceux de la culture en terre proviennent sûrement du fait que dans les cultures hydroponiques nous avons pris des plantes très jeunes ; dans les cultures en terre, il s'agissait de plantes parvenues à maturité.

EN RÉSUMÉ

Les plantes possèdent, autour de leurs racines, un véritable manchon de microorganismes parmi lesquels se trouvent, en bon nombre, des germes pectinolytiques. Comme nous le montre toute l'étude précédente, chaque plante, entourée d'une microflore pectinolytique qui lui est propre, est en quelque sorte un cas spécial. Quel est le rôle des germes pectinolytiques autour des racines ? Il ne nous a pas été pos-

sible de le préciser, bien que certains germes sécrètent leur enzyme pectinolytique en présence de celles-ci. Pour Roudakoff et Birkel (82), l'action des Bactéries pectinolytiques, sur le système racinaire du trèfle, permet la formation de structures solides du sol, ainsi que l'augmentation des rhizomes. Si le rôle de ces enzymes est incertain durant le vivant de la plante, nous pensons que lors de sa mort ils sont de première importance. Comme la plante n'offre plus de résistance, les enzymes vont ramollir les tissus radiculaires. Ils laissent ainsi pénétrer la foule de microorganismes (et entre autres les pectinolytiques), nécessaires à la destruction des tissus organisés qui retournent à l'état minéralisé.

TROISIÈME PARTIE

DESCRIPTION
ET POSITION SYSTÉMATIQUE
DES MICROORGANISMES PECTINOLYTIQUES
ISOLÉS, EN PARTICULIER,
DES BACTÉRIES

Depuis le début du siècle, le nombre d'espèces bactériennes pectinolytiques connues n'a pas cessé de croître. Maintenant, encore, il n'est pas une année où ne paraît une publication concernant l'activité pectinolytiques d'espèces déjà connues ou d'espèces nouvelles.

La multitude des classifications proposées ainsi que les techniques d'identification très différentes employées font souvent naître des confusions. Tel auteur affirmera qu'une espèce est pectinolytique alors qu'un autre soutiendra le contraire ; or, très souvent, ces faits proviennent d'une mauvaise identification du germe. L'étude que nous proposons repose sur la systématique dite de l'*École Française* (130) (17), qui, de loin, est la plus logique. Elle tient compte, avant tout, de la morphologie du microorganisme, morphologie qui indique l'appartenance à la famille et au genre. Vient, ensuite, la détermination des espèces différenciées entre elles par la nature de leurs enzymes majeures. Les enzymes pectinolytiques sont toutes des enzymes majeures.

Ainsi, une Bactérie qui est pectinolytique et une seconde qui ne l'est pas mais qui possède toutes les autres caractéristiques de la première sont deux espèces distinctes. Il en est de même pour deux Bactéries pectinolytiques dont les caractéristiques sont identiques mais qui sécrètent des enzymes de la pectinolyse différentes.

Cette doctrine n'a pas facilité la détermination de nos souches ; la plupart des Bactéries décrites, par exemple dans le *Bergey's Manual*, n'ont pas été étudiées du point de vue de la pectinolyse. De plus, il nous a été impossible d'obtenir, des différentes collections, les souches que nous demandions. Nous aurions donc été tenté de décrire chaque fois des espèces nouvelles avec nos souches pectinolytiques ; mais nous estimons ne pas devoir encore allonger la liste déjà trop longue des espèces de certains genres. Aussi, avons-nous maintes fois, attribué bon nombre de nos souches à des espèces dont le pouvoir pectinolytique n'avait pas été étudié, concordant par les autres enzymes majeures avec les souches en question.

Les techniques d'études, pour la classification des différents germes, sont, dans les grandes lignes, celles employées couramment par les bactériologistes et, d'une manière plus particulière, par ceux de l'Institut Pasteur (131) (17). Toutefois, les pectinolytiques et surtout les germes anaérobies s'adaptent mal aux milieux habituels. Nous croyons donc opportun de donner sommairement quelques détails techniques concernant l'identification de ces germes.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES DE DÉTERMINATIONS DES BACTÉRIES PECTINOLYTIQUES

A. — AÉROBIES

Les germes sporulés sporulent, rapidement et en abondance, sur gélose inclinée pdt-1. Par un test de thermorésistance, on s'assurera également de la présence ou de l'absence de spores. Une culture jeune, sur eau peptonée, renseigne sur l'état du Gram, la dimension, la morphologie, la mobilité et sur les cils des germes. Le degré d'aérobiose se voit sur gélose profonde pdt-1 (1^{re} partie, chapitre II) (aérobie strict, facultatif). La morphologie des colonies et leur couleur sont données par une culture sur gélose inclinée pdt-1 : pour apprécier la gélatinase 120 g $\%$ de gélatine sont additionnés au bouillon pdt-1. L'ensemencement du lait et du lait tournesolé se fait à partir d'une culture jeune, sur eau peptonée. On recherche la digestion du sérum sur le milieu de Loeffler. L'eau peptonée, qui donne toujours des cultures rapides et abondantes, sert, additionnée de 5 $\%$ de nitrate de sodium, au test de la réduction des nitrates en nitrites. Mais, en aucun cas, il ne faut employer cette eau peptonée pour l'attaque des sucres car maints aérobies pectinolytiques, et spécialement les *Empedobacter*, ne montrent pas leur pouvoir glucidolytique sur ce milieu. On additionne 1 % des glucides à étudier sur le milieu suivant :

Solution standard de Winogradsky	50 cm ³
Extrait de terre	50 »
Nitrate d'ammonium	3 g
Eau distillée	900 cm ³

Répartition à raison de 6 cm³ en tubes de 14 mm ; stérilisation : 1/2 heure à 110° C.

L'utilisation des citrates se traduit par un virage du milieu de Koser-Simon au bleu foncé.

La présence d'indole et de NH₃ peut être détectée sur eau peptonée

(sans indole) de même que le dégagement de SH_2 . Les activités uréasique et catalasique sont recherchées avec des germes prélevés sur une gélose inclinée pdt-1 et mis en présence des réactifs correspondants (réactif de Fergusson pour l'uréase et H_2O_2 pour la catalase).

B. — ANAÉROBIES

La plupart du temps, le milieu bpdt donne des cultures avec quelques spores. Le Gram des germes, ainsi que les dimensions de la Bactérie, sa mobilité, ses cils, sa capsule, peuvent être observés avec une culture très jeune, en milieu pdt-1. Le type d'anaérobiose (strict, facultatif) se voit sur gélose profonde pdt-1, de même que la forme, la dimension des colonies et parfois leur pigmentation. On note ensuite la possibilité de culture sur bouillon viande-foie (VF) ou sur eau peptonée.

Un excellent milieu qui peut remplacer eau peptonée et VF est le milieu ep-1-(g) :

Peptone de viande (Uclaf)	15 g
Extrait de levure Byla ou Difco	7 »
Glucose	10 »
Eau distillée	1 000 cm ³

Neutralisation à la soude si nécessaire.

Répartition, en tubes de 14, à raison de 6 cm³, ou en tubes de Hall. Stérilisation : 1/2 heure à 115° C ; le glucose peut être remplacé par d'autres sucres. Pour avoir des résultats sûrs, l'ensemencement du lait se fait à partir de ce milieu. On recherche la gélatinase en ajoutant 120 g de gélatine, par litre, aux milieux suivants : pdt-1, ep-1g, DBM. Les résultats positifs ne se traduisent souvent qu'au bout de 2 mois d'étuve.

Avec le test de Kohn, l'activité gélatinasiq ue apparaît beaucoup plus rapidement (2 jours au lieu de 2 mois). Les petits cubes de gélatine sont transportés stérilement dans des tubes de bouillon pdt-1. Les tubes sont régénérés et ensemencés avec la souche à étudier. La dissolution du cube traduit une activité gélatinasiq ue positive.

Préparation des cubes de gélatine :

Fondre au bain-marie à 100° C, jusqu'à totale liquéfaction :

Gélatine	15 g
Charbon végétal pulvérisé ...	5 »
Eau	100 cm ³

Refroidir à 30° C environ, étaler des rubans de 5 mm de large dans une gouttière plastique. Laisser solidifier à la glacière. Placer les rubans, 24 heures, dans du formol à 10 %. Les recueillir et les découper en morceaux de 1 cm de long. Déposer les cubes dans une gaze et rincer à l'eau courante pendant 24 heures. Les morceaux ainsi traités sont immergés dans l'eau distillée et stérilisés 1 heure, à 100° C.

La digestion des protéines coagulées doit être recherchée sur milieu DBM (milieu à base de digestat bactérien de maïs). Mettre, dans une fiole d'Erlenmeyer de 3 litres, 250 g de maïs entier pulvérisé (semoule de maïs) et ajouter 1 750 cm³ d'eau distillée. Stériliser à 120° C pendant 2 heures. Refroidir brusquement à 37° C, ensemencer avec une culture de *Clostridium eruptens*, souche 314, et placer, 48 heures, dans l'étuve à 37° C. Arrêter la digestion, par un chauffage à 100° C, pendant 30 minutes. Filtrer sur papier Laurent. Prendre 300 cm³ de filtrat, compléter avec 700 cm³ d'eau distillée et 10 g de carbonate de calcium. Chauffer jusqu'à ébullition, filtrer, additionner 10 g de glucose, répartir en tubes de 14 mm à raison de 6 cm³ par tube et ajouter les morceaux de protéines coagulées (blanc d'œuf, sérum coagulé, etc.).

L'attaque des sucres se fait, sur milieu ep-1, avec 1 % des sucres à étudier (ces derniers mis sous forme de solutions concentrées stériles de l'Institut Pasteur). L'addition de 5 ‰ de nitrate de sodium aux milieux ep-1-glucides permet, en outre, de rechercher la réduction des nitrates en nitrites (réactif classique : acide sulfanilique + α -naphthylamine). Les cultures, dans ce cas, doivent être très jeunes (moins de 24 heures). La réduction des sulfites en sulfures se trouve par l'addition de sulfite de sodium et d'alun de fer aux géloses profondes pdt-1 : les germes réduisant les sulfites donnent des colonies noires (131).

Enfin, l'ensemencement du germe dans un Erlenmeyer d'un litre, contenant 750 cm³ de bouillie de pommes de terre spéciale, donne suffisamment de liquide de culture pour mettre en évidence les produits terminaux de fermentation (produits volatils, alcalins et neutres : amines volatiles, aldéhydes, alcools, cétones, phénols, crésols, indole, scatole ; produits acides : acides volatils par chromatographie, dosage de l'acidité volatile totale, acide lactique, succinique, acétoïne (131)).

Le milieu à la bouillie de pommes de terre employé ici est plus concentré que la bouillie répartie en tubes : 750 g de pomme de terre par litre d'eau ; faire bouillir 1/2 heure, passer au moulin à légume ou au mixer, répartir en Erlenmeyer d'un litre, à raison de 700 à 850 cm³ par Erlen ; stérilisation : 1/2 heure à 110° C. Avant l'utilisation, on « régénère » les Erlenmeyer pendant 1/2 heure, à 100° C, au bain-marie et on refroidit. On ensemence avec un tube de culture fraîche, en milieu pdt-1. Ce milieu est excellent pour la production éventuelle de pigments. Le dégagement de SH₂ est détecté par le noircissement d'un

papier imprégné de sous-acétate de plomb et maintenu, au-dessus d'une culture, dans le milieu epl-g. Pour mesurer les activités uréasique et catalasique, on centrifuge une culture sur milieu pdt-l. Les corps microbiens sont alors répartis dans le réactif de Fergusson pour l'activité uréasique et, dans l'eau oxygénée à 12 volumes, pour une catalase éventuelle. Enfin, on peut mesurer le pouvoir pathogène des germes (rare chez les pectinolytiques) par injection intrapéritonéale au cobaye, de 1 cm³ d'une culture sur epl-g.

CHAPITRE II

ASPORULALES (Eubacteria asporulées)

ORDRE II. — Bactériales.

Famille IV. — PSEUDOMONADACEÆ.

Genre. — *Pseudomonas*.

Ce genre, si caractéristique avec ses bâtonnets droits, mobiles (ciliation polaire), Gram-négatifs, produisant un pigment vert-bleu dans le milieu de culture, nous a donné de nombreuses souches.

Le pigment apparaît bien en gélose inclinée VF (viande-foie) et très peu sur les milieux pdt ou les eaux peptonées.

Souche 46 (isolée du plancton du lac Catherine, Ruwenzori). C'est un petit bâtonnet de 1-1,5 μ de long sur 0,3-0,4 μ de large, asporulé, mobile, grâce à une touffe de cils polaires, Gram-négatif.

Aérobic strict, culture aisée à 37° C.

Colonies rondes, blanches, convexes, visqueuses sur gélose inclinée, avec production d'un pigment vert dans la gélose.

Sur eau peptonée et bouillon VF glucosé, il donne un fort trouble homogène, sans voile.

Gélatine : liquéfiée.

Lait tournesolé : d'abord acidifié puis réduit avec coagulation et digestion, ensuite, recoloration alcaline.

Les glucides suivants sont attaqués avec formation de gaz : lévulose, galactose, glucose, saccharose, maltose.

Les nitrates sont réduits en nitrites jusqu'au stade NH_3 .

Production d'acétoïne, de SH_2 , pas d'indole.

C'est un *Pseudomonas* typique que nous avons isolé, la seule souche poussant bien à 37° C. Il correspond exactement à la description de *Ps. sauromali* (nv. comb.) Brisou, 1958, donnée par Conti et Crowley, sous le nom de *Bacterium sauromali* (Bergey, 6^e édition, p. 461). Toutefois, notre germe n'est pas pathogène pour les animaux. On peut donc penser qu'il s'agit d'une forme particulièrement adaptée au sol.

Souches 47/48 et 09/3 isolées du lac Catherine et du lac de la Lune (Ruwenzori).

Bâtonnets droits ou légèrement incurvés, isolés ou en paires, de 1,7-4 μ de long sur 0,8 μ de large, mobiles grâce à deux grands cils polaires. La souche 17/48 montre une coloration plus foncée aux deux pôles, Gram-négatif.

Aérobie strict, ne se cultivant pas à 37° C, optimum : 28° C.

Colonies rondes de 1-3 mm de diamètre, blanc sale, crémeuses, sécrétant un pigment vert dans la gélose.

Sur bouillon et eau peptonée, formation d'un trouble uniforme puis d'une fine pellicule en surface.

Gélatine liquéfiée.

Lait tournesolé : coagulé puis digéré, acidifié et réduit.

Glucides : seul le glucose est faiblement fermenté.

Nitrates fortement réduits en nitrites, gaz (CO₂) à partir des nitrates avec la souche 17/48.

Acétoïne, SH₂, indole non produits.

La classification de ces deux souches est bien discutable. Nous avons pensé à 4 germes :

Ps. fluorescens : celui-ci, cependant, alcalinise le lait.

Ps. fairmountensis : en principe, il ne réduit pas les nitrates et n'est pas glucidolytique.

Ps. solanacearum : cette espèce donne un pigment brun caractéristique que nous n'avons pas observé.

Enfin, *Ps. boreopolis* qui se rapproche le plus de nos deux souches. Le Manuel de Bergey (6^e édition) le classe parmi le groupe ne poussant pas à 37° C, alors que la 7^e édition propose le contraire. Nous pensons donc que nos deux souches sont une variété de *Ps. boreopolis*.

Souches 42/4, 42/5, 42/4 M du lac Noir (Ruwenzori).

Souches 44/1 et 44/3 du lac Noir (Ruwenzori).

Et 4 souches VcL4, RsM₂, TM₂, TF ; isolées des terres du type C, de la rhizosphère du maïs et du lin, en culture hydroponique.

Ce sont des bâtonnets droits, isolés ou en paires, mobiles par cils polaires, Gram-négatifs de 2 à 5 μ de long sur 0,5 à 0,7 μ de large.

Ce sont des aérobies stricts, ne se cultivant pas à 37° C (opt. : 28° C).

Les colonies sont rondes, blanc gris, très visqueuses, donnant un pigment vert dans la gélose.

Sur bouillon, nous obtenons un trouble uniforme puis un voile. Production de NH₃.

Gélatine : digérée.

Lait tournesolé : peu acidifié, légèrement coagulé et lentement digéré.

Glucides : glucose faiblement fermenté, parfois aussi galactose.

Nitrates : non réduits.

Pas d'acétoïne, de SH_2 , ni d'indole.

Ces 9 souches appartiennent sans doute à *Ps. schuyllkilliensis*. La 7^e édition du Bergey décrit ce germe comme alcalinisant le lait, contrairement à la 6^e édition. Nous pensons donc rattacher à cette espèce la souche RsK4 (rhizosphère du Kochia) qui alcalinise le lait. Deux souches RsSN et RsAP de la rhizosphère de *Solanum nigrum* et d'*Atriplex patula* ont des caractères voisins de *Ps. schuyllkilliensis*. Cependant, elles ne sont pas glucidolytiques et produisent acétoïne et SH_2 . Nous les rattacherons donc à *Ps. fairmountensis*, germe non glucidolytique. La 6^e édition du Bergey le montre comme alcalinisant le lait, alors que la 7^e indique une acidification et en modifie l'orthographe (*fairmontensis*). Il faut maintenir l'orthographe de Whright qui, le premier, a décrit ce germe.

Parmi les germes non gélatinolytiques, nous ne possédons qu'une seule souche : S 20, isolée de l'intestin d'une saupe (*Box salpa* L.) pêchée au large des côtes de Monaco.

Bâtonnets droits, de 2-3 μ de long sur 0,7 μ de large, Gram-négatifs, mobiles par cils polaires.

Aérobie strict, ne se cultivant pas à 37° C.

Colonies rondes, d'un blanc crémeux ; la gélose devient verte rapidement.

En eau peptonée ou sur bouillon, il se forme un voile qui tombe au fond du tube ; un autre voile se reforme alors aussitôt, et ainsi plusieurs fois de suite.

Gélatine non liquéfiée.

Lait réduit, très légèrement alcalin, non coagulé, ni digéré.

Glucose, galactose, glycérine fermentés.

Nitrates réduits en nitrites et NH_3 .

SH_2 , acétoïne, indole négatifs.

Uréase positive.

L'espèce la plus voisine semble *Ps. putida*. Nous avons donc rattaché notre souche à celle-ci, bien que le Bergey ne mentionne pas si *putida* attaque ou non les glucides.

Nous résumons dans le tableau IX la classification de nos souches (G = gélatinolyse, N = réduction des nitrates, Gl = glucidolyse).

Parmi ces 15 souches, aucune n'a pu être identifiée comme *Ps. fluorescens*. Aucune de ces espèces n'avait été étudiée du point de vue de la pectinolyse ; aussi ne sommes-nous pas en contradiction avec la description de l'auteur ; nous ajoutons à ces germes cette propriété qui ne leur était pas connue : sur plaques de pectine W3, les godets sont petits (1 mm de diamètre) ; peu profonds et blancs.

TABLEAU IX. — Classification des *Pseudomonas pectinolytiques*.

G + N + Gl +	G + N + Gl —	G + N — Gl —	G + N — Gl +	G — N + Gl +	G — N — Gl +	G — N + Gl —	G — N — Gl —
Culture à 37° C		<i>Ps. fair- mountensis</i> (2)	<i>Ps. schuytkil- iensis</i> (9) + une variété alcalinisante	<i>Ps. putida</i> (1)			
<i>Ps. sauromali</i> (1)							
Culture à 28° C							
<i>Ps. boreopolis</i> (2)							
Entre parenthèses, le nombre de souches.							

Genre *Empedobacter* Brisou, 1957.

Ce genre défini par Brisou, pour séparer les anciens *Flavobacterium* immobiles des *Flavobacterium* vrais mobiles, nous a fourni de très nombreuses souches.

23 souches possèdent les caractéristiques suivantes (soient : 03/15, 03/23, 05/40, 15/16, 24/1, 24/7, 17/48 du Ruwenzori plus 16 autres souches isolées de terres, de boues, de litières et de la rhizosphère d'échantillons français).

Ce sont des bâtonnets minces, de 4-6 μ de long sur 0,4 μ de large et, plus rarement, des amas coccoïdes et des filaments plus ou moins longs, sinueux, toujours immobiles, Gram-négatifs, asporulés (fig. 13).

Ils sont aérobies stricts, ne se cultivant pas à 37° C (maximum 36° C, optimum 28° C).

Les colonies sur géloses sont rondes de 1 à 4 mm de diamètre, pâteuses ou crémeuses de consistance, parfois sèches et se détachant d'un seul bloc, mais toujours pigmentées d'un bel orangé et légèrement translucides. Sur plaque de pectine W3, les colonies forment de grands godets profonds et nettement découpés qui tendent, ensuite, à envahir la plaque.

En milieu liquide, ce germe forme d'abord un trouble très léger, avec ondes moirées, puis le trouble s'accroît. Au bout de 15 jours,

une fine pellicule orange apparaît et s'épaissit ; celle-ci n'adhère pas au tube mais flotte librement sur le liquide.

Gélatine lentement liquéfiée.

Lait tournesolé réduit et très peu acidifié (parfois inchangé), non coagulé ; digestion de la caséine extrêmement lente et se réduisant la plupart du temps, à un éclaircissement de 2 mm à partir de la surface. Une souche alcalinise le lait.

Sérum coagulé : non attaqué.

Glucides : xylose, arabinose, galactose, lévulose, glucose, maltose, lactose, amidon, glycérine attaqués sur milieux minéraux. L'attaque des sucres est très différente et irrégulière sur eau peptonée.

Citrates non utilisés comme seule source de carbone.

Nitrates réduits en nitrites ; quelques souches dégagent du gaz à partir des nitrates.

Cette description correspond exactement à celle du germe décrit par Dorey en 1959, sous le nom de *Flavobacterium pectinovorum*. L'auteur l'avait isolé dans différentes terres d'Angleterre.

En tenant compte de la classification française, nous devons transférer ce germe au genre *Empedobacter*, car il est immobile et acilié. Nous l'appellerons *Empedobacter pectinovorum* (Dorey) nv. comb.

Quatre souches (entre autres : la souche 44 du Ruwenzori) sont semblables à *E. pectinovorum* mais ne fermentent pas le lactose. Il s'agit d'*Empedobacter dormitator* (Wright, Bergey et al.) nv. comb. Brisou, 1958, isolé sous le nom de *Flavobacterium dormitator*, par les auteurs américains, à partir d'eau douce et d'eau de mer. Nos souches ont le même habitat que *E. pectinovorum*.

Une souche seulement (RsKB), d'ailleurs fort peu pectinolytique, ne fermente pas du tout les glucides. Sans cela, elle est en tout point identique à *E. pectinovorum* et se rapproche beaucoup d'*E. balustinum* (Harrison) nv. comb. Brisou, 1958, dont elle n'est qu'une variété non halophile.

Les nitrates sont fortement réduits en nitrites par cette souche, alors que le germe de Harrison ne produisait des nitrites qu'en petite quantité. Nous l'avons isolée de la rhizosphère du *Kochia*.

Nous restons dans le groupe des *Empedobacter*, en forme de bâtonnets minces, avec 13 souches européennes qui ne diffèrent d'*E. pectinovorum* que par l'absence de nitrate-réductase. Elles correspondent exactement à la description d'*Empedobacter aquatilis* (Franckland, Bergey) nv. comb. Brisou, 1958. L'habitat est le même que pour *E. pectinovorum* : eau, boues, sols, litières végétales, rhizosphère.

La rhizosphère du *Kochia* et la terre B3 ont livré deux souches intéressantes (RsK6, H5). Nous avons à nouveau des bâtonnets minces de 3-6 μ de long sur 0,4 μ de large. Mais les colonies formées sur gélose

inclinée sont d'un jaune verdâtre (jaune canari) et elles deviennent plus sombres, pour aboutir à un vert olive foncé. La culture est extrêmement capricieuse et lente. Sur bouillon, nous avons un trouble uniforme et la formation d'une pellicule de surface jaune verte (forme production de NH_3).

Gélatine liquéfiée.

Lait tournesolé acidifié, réduit, puis digéré peu à peu sans coagulation.

Le sérum de Loeffler est lentement digéré.

Galactose, maltose fermentés.

Lévulose, glucose, saccharose, lactose, amidon, xylose et arabinose faiblement fermentés. Glycérine non attaquée.

Cellulolyse négative.

Nitrates non réduits en nitrites.

Uréase négative.

SH_2 positif, acétoïne et indole négatifs.

Ces deux souches se distinguent d'*E. aquatilis* surtout par la digestion du sérum. Nous ne pourrions donc l'assimiler à une variété de cette espèce. La couleur verte des colonies, la forte production de NH_3 , de même que la moindre glucidolyse (glycérine) viennent confirmer ce fait. Il reste *E. iridescens* (*Pseudomonas iridescens*, Bergey, 6°), très voisin de nos souches ; cependant celui-ci ne convient pas non plus car il digère la cellulose. Nous pensons avoir une espèce nouvelle :

Empedobacter viride n. sp.

La souche 16/49, isolée du lac Blanc Principal (Ruwenzori) est, parmi nos *Empedobacter*, l'unique souche ne liquéfiant pas la gélatine. A part ce caractère, elle ressemble beaucoup à *E. pectinovorum*. C'est un bâtonnet mince mais les cultures sur bouillon sont visqueuses et la pellicule orange qui se forme est plus épaisse et adhère aux parois du tube.

Le lait tournesolé est réduit et peu ou pas digéré.

Le sérum de Loeffler ne l'est pas.

Lévulose, galactose, glucose, amidon sont fermentés. Saccharose, maltose, lactose le sont faiblement. Xylose, arabinose, glycérine ne le sont pas.

Les nitrates sont réduits en nitrites (pas de NH_3).

Pas d'acétoïne, de SH_2 ni d'indole.

Uréase absente. Citrates non utilisés.

Dans le groupe des *Empedobacter* non gélatinolytiques, glucidolytiques et nitratoréducteurs, nous connaissons quatre espèces : *E. proteus*, *E. flavotenuis*, *E. polyglutaminum* qui n'attaquent pas le lactose. Il

reste *E. inertia*, germe qui digère l'agar et possède une uréase. Nous ne pouvons identifier notre souche à l'une de ces quatre espèces. Nous sommes en présence d'une espèce nouvelle que nous nommerons :

Empedobacter exile nov. sp.

Vient le deuxième groupe d'*Empedobacter* pectinolytiques qui comprend des bâtonnets plus épais et plus courts bien que les filaments ne soient pas absents. Les germes de ce groupe auront donc un aspect trapu par rapport à ceux du premier qui sont minces et effilés (fig. 14).

La souche Ph a été isolée dans une formation tourbeuse, rougeâtre, parmi les roseaux de l'étang de Dampierre (D7). Bâtonnets de 2-7 μ de long (moyenne 3-4) sur 0,5 à 0,7 μ de large, filaments rares, asporulés, Gram-négatifs, immobiles, aciliés.

Aérobic strict, culture optima à 30° C, ne pousse pas à 37° C.

Colonies rondes, de 4 à 5 mm de diamètre, orange, convexes, de consistance crémeuse, non translucides.

Sur eau peptonée, et bouillon, il y a un trouble épais puis paraît une pellicule effilochée, visqueuse, jaune orange.

Gélatine liquéfiée.

Lait tournesolé : alcalinisé fortement et digéré sans coagulation, en 24 heures.

Sérum de Loeffler : liquéfié.

Glucidolyse : arabinose, glucose, lévulose, maltose, amidon, glycérine attaqués faiblement. Lactose non attaqué.

Les citrates sont utilisés comme seule source de carbone.

Nitrates réduits en nitrites et formation de NH_3 .

Production d'acétoïne, SH_2 et indole.

Uréase négative.

Nous n'avons pu identifier ce germe à aucune espèce déjà décrite. Les deux *Empedobacter*, connus pour l'alcalinisation du lait, sont bien : *E. lutescens* et *E. fucatum* mais ni l'un ni l'autre ne sont glucidolytiques. Il n'a pas été possible, non plus, d'en faire une variété d'*E. balustinum* car ce dernier ne digère pas le sérum, ni une variété d'*E. bufo* qui n'a pas de caséase ; *E. dormitator* se trouve dans le même cas. Nous avons donc une espèce nouvelle nommée :

Empedobacter arundineti nv. sp.

Les souches RsSn, Tf, Ber, 42/5, isolées respectivement de la rhizosphère de *Solanum nigrum*, de la boue D5, du terreau n° 6 et du lac Noir (Ruvenzori) ne se distinguent d'*E. arundineti* que par l'absence

de nitrate-réductase. Les quatre souches ne sont pas exactement identiques entre elles : Tt par exemple, outre son pigment orange, produit un pigment brun qui finit par noircir le milieu.

RsSN, au contraire, est beaucoup plus pâle. La souche du Ruwenzori mérite d'être distinguée en variété : ses bâtonnets sont plus minces et à peine plus épais que ceux des *Empedobacter* du premier groupe ; le lait est alcalinisé et digéré en une semaine au lieu de 24 à 48 heures ; elle ne produit ni acétoïne, ni SH_2 , ni indole.

E. polysiphoniae, *E. delesseriei*, *E. dræbachense* sont trois espèces déjà décrites, qui se rapprochent le plus des quatre souches. Elles s'en distinguent cependant d'emblée en ce qu'elles digèrent l'agar et n'attaquent que l'amidon parmi les glucides. *E. iridescens*, *E. nicholsi* et *E. aquatile* fermentent toutes le lactose ; nous ne pouvons donc rattacher nos quatre souches à aucune de ces six espèces. Nous pensons qu'il s'agit d'une espèce nouvelle :

Empedobacter radicum nov. sp.

et *Empedobacter radicum* var. *ruwenzori* nov. sp. nov. var. pour la souche 42/5 du Ruwenzori (fig. 14).

La souche PpT, qui termine l'étude de ce genre, a été isolée d'un bulbe de tulipe pourrie. Nous ne savons pas, toutefois, si elle est la cause de cette pourriture ou seulement un saprophyte.

C'est un bâtonnet qui, par sa taille, appartient au deuxième groupe d'*Empedobacter* pectinolytiques. Il est aérobic strict et ne se cultive pas à 37° C (opt. 28° C).

Les colonies sont rondes, orange, très visqueuses.

En eau peptonée et en bouillon, ce germe donne un fort trouble puis une très grosse pellicule orange et gluante en surface. Le milieu est rendu complètement visqueux par la sécrétion d'un mucus. Le dépôt au fond du tube n'est pas orange mais blanc. Il y a donc absence de formation du pigment sous tension d'oxygène réduite.

Lait tournesolé réduit lentement et tolament digéré.

Sérum de Loeffler digéré peu à peu.

Lipides attaqués (positif sur tween 40 et 60).

Glucides : non fermentés.

Nitrates : non réduits.

Production de SH_2 , de NH_3 et d'indole.

Empedobacter esteroaromaticum (Omélianski, Bergey) nv. comb. Bri-sou, 1958, correspond, dans ses grands traits, à notre souche. La seule différence est l'odeur caractéristique que nous n'avons pas retrouvée

TABLEAU X. — *Classification des Empedobacter pectinolytiques.*

G + N + Gl +	G + N + Gl —	G + N — Gl +	G — N + Gl +	G — N + Gl —	G — N — Gl +	G — N — Gl —
<i>E. pectinovorum</i> (23) Lactose +.			<i>E. aquatile</i> (13). Lactose +.	<i>E. exilis</i> n. sp. (1) Non uréoly- tique.		
<i>E. dormitator</i> (4) Lactose —.			<i>E. viride</i> n. sp. (1) Lactose +. Sérum digéré, pigment vert- jaune.			
	<i>E. balustinum</i> (1).					
<i>E. arundineti</i> n. sp. (1). Lactose —. Sérum digéré, lait alcalin.		<i>E. estero-aro- maticum</i> (1). Var. <i>viscosa</i> nv. var.	<i>E. radicum</i> n. sp. (4) Lactose —. Sérum digéré, lait alcalin et sa variété <i>ru- wenzorii</i> nv. var. <i>indole</i>			

Bâtonnets
mincesBâtonnets
plus épais

Entre parenthèses, le nombre de souches.

G : gélatinolyse.

N : réduction des nitrates.

Gl : glucadolyse.

dans la nôtre. Il s'agit certainement d'une variété que nous nommerons :

Empedobacter esteroaromaticum var. *viscosa* nov. var.

Nous résumons, dans le tableau X, la liste des *Empedobacter* pectinolytiques. C'est un genre qui possède de nombreuses espèces pectinolytiques (actuellement 9). Seul *E. pectinovorum* a été décrit tout récemment par Dorey comme pectinolytique. Cet auteur le classe toutefois parmi les *Flavobacterium* genre duquel nous n'avons isolé aucune espèce.

Genre *Xanthomonas*.

Nous avons isolé une souche de ce genre, tout à fait par hasard, au milieu de godets à *Empedobacter* (boue végétale de l'étang des Trivaux).

Ce sont des petits bâtonnets de 2 μ de long sur 0,5 μ de large, Gram-négatifs, très mobiles avec 1 ou 2 cils polaires (fig. 15).

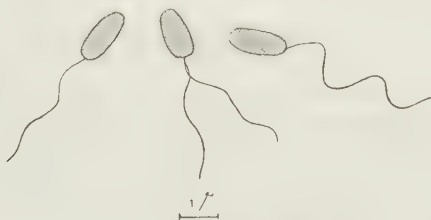


FIG. 15. — *Xanthomonas vascularum* var. *palustris*.

Aérobic facultatif (croissance positive en tube scellé).

Culture optimum à 28° C.

Sur gélose inclinée, les colonies sont rondes, convexes, de 2 mm de diamètre, oranges, visqueuses, non translucides.

Sur eau peptonée ou bouillon, il n'y a pas de trouble mais formation d'une pellicule effilochée, en surface du liquide.

Gélatine liquéfiée.

Lait tournesolé : digéré sans coagulation préalable, alcalin puis réduit.

Sérum de Loeffler : liquéfié, digéré.

Lipides : halo très positif sur tween 80, pas de halo sur tween 60 et 40.

Glucides : xylose, arabinose, lévulose, galactose, glucose, maltose, amidon, glycérine fermentés ; saccharose et lactose non fermentés ; seul le galactose est attaqué en eau peptonée.

Cellulose non fermentée.

Citrates utilisés.

Nitrates réduits en nitrites.

Production de SH_2 et de NH_3 . Pas d'acétoïne ni d'indole.

Uréase négative.

Pouvoir phytopathogène : nul sur géranium et carotte (inoculation après de nombreuses subcultures).

Ce germe, très protéolytique et lipidolytique, avec flagelles polaires, appartient incontestablement au genre *Xanthomonas*. L'absence de pouvoir pathogène peut être aisément expliquée, soit par la perte de ce pouvoir après subcultures, soit parce que nous n'avons pas utilisé la plante réceptive. Bien connu pour son activité pectinolytique, *Xanthomonas vascularum* est le germe dont la description se rapproche le plus de notre souche. Cependant, la nôtre produisant SH_2 et NH_3 , il s'agit sans doute d'une variété de ce germe. Nous nommerons la souche TrE2 :

X. vascularum var. *palustris* nv. var.

Genre *Erwinia*.

La souche DE, isolée de la boue E3, à odeur de SH_2 , est la seule qui corresponde à la définition de ce genre. Ce sont des bâtonnets droits, à bouts ronds, isolés ou en paires, de 2-3 μ de long sur 0,5 à 0,7 μ de large, asporulés, Gram-négatifs, mobiles, avec cils péritriches.

Aérobie facultatif, ne se cultivant pas à 37° C (opt. 28° C). Colonies rondes, plates, de toutes tailles, blanc gris, translucides non visqueuses, pas de production de pigment.

Sur eau peptonée ou bouillon : trouble fort homogène, blanc.

Gélatine : liquéfiée.

Lait tournesolé : réduit, coagulé et lentement digéré.

Non lipidolytique.

Sérum non digéré.

Glucides : lévulose, galactose, glucose, saccharose fermentés avec dégagement gazeux (eau peptonée).

En milieu minéral, les mêmes glucides sont attaqués mais sans dégagement gazeux.

Nitrates réduits en nitrites.

Acétoïne, SH_2 et NH_3 .

Pas d'uréase.

Pouvoir phytopathogène : nul sur *Pelargonium* et carotte (inoculation après de nombreuses subcultures).

Il s'agit bien d'une *Erwinia*. Notre souche correspond tout à fait à

la description d'*E. betivora*, connue pour son pouvoir pectinolytique et qui est l'espèce-type de ce genre. Un seul caractère différencie notre souche du germe de Magrou : elle ne se cultive pas au-delà de 30° C.

Genre *Achromotacter* (Bergey et al.)

J. Brisou et A.-R. Prévot *emend.* 1954.

Souche RsAP (r-b), isolée de la rhizosphère d'*Atriplex patula*. Ce sont des bâtonnets assez polymorphes, droits ou sinueux, très vacuolés, à bouts ronds, asporulés, Gram-négatifs, mobiles, avec ciliation péritriche, de 4 à 10 μ de long sur 0,4 μ de large.

Aérobie strict, ne pousse pas à 37° C (opt. 28° C).

Les colonies sont rondes, convexes, blanches, non translucides, de 2 mm de diamètre, dures et adhérant fortement au substrat.

Culture très capricieuse.

Sur eau peptonée ou bouillon, ce germe forme un trouble faible en même temps qu'un voile homogène blanc en surface.

Ne croît pas en bouillon VF.

Gélatine non liquéfiée.

Lait lentement digéré, sans coagulation, alcalin.

Glucides : non attaqués.

Nitrates : non réduits en nitrites.

Production de SH₂ et NH₃, pas d'acétoïne ni d'indole.

Uréase négative.

Dans le groupe des *Achromobacter* non gélatinolytiques non nitrato-réducteurs et non glucidolytiques, nous ne connaissons qu'une seule espèce : *Achromobacter mariense* (Hauduroy, 1937) *nv. comb.* Brisou, 1958. Sa description et celle de notre souche concordent dans les grandes lignes. La seule différence est l'absence de culture à 37° C de la nôtre. C'est, sans doute, une forme particulièrement bien adaptée au sol.

Souche 118 A, isolée du lac du Visoke (lac volcanique du Congo). Nous avons des bâtonnets isolés ou en paires, à bouts ovales, un peu renflés, de 4-6 μ de long sur 0,8 μ de large ; sur gélose, beaucoup de longs filaments. Gram-négatifs, asporulés, mobiles, avec cils péritriches.

Aérobie strict, pas de culture à 37° C (opt. 28° C).

Colonies rondes, visqueuses, blanches avec centre concave.

Culture très capricieuse.

Sur eau peptonée ou bouillon, il se forme une pellicule visqueuse en surface (pas de trouble).

Gélatine non liquéfiée.

Lait tournesolé : réduit lentement par le haut, ni coagulé, ni digéré.

Glucides non attaqués.

Nitrates non réduits en nitrites.

NH₃ produit. Pas de SH₂, d'acétoïne ni d'indole.

Uréase négative.

Cette souche appartient au même groupe que le germe précédent, mais en diffère nettement par l'absence de caséase, la non-alcalinisation du lait et la non-production de SH₂. Ceci nous conduit à l'espèce *Achromobacter venenosum* (Vaughan) Bergey, 1923, qui s'oppose au groupe d'*Achromobacter alcaligenes* par la non-alcalinisation du lait.

Les souches 72/4 et 72/6 (Lac Kitandara Supérieur, Ruwenzori) sont des germes très peu pectinolytiques et d'une culture extrêmement capricieuse et lente. Ce sont des bâtonnets droits, isolés ou en paires, vacuolés, légèrement renflés en navette, à bouts ovales de 3-4 μ de long sur 0,7 μ de large.

Gram-négatifs, mobiles par cils péritriches, asporulés.

Aérobie strict, ne se cultivant pas à 37° C (opt. 28° C).

Les colonies de 2 mm de diamètre sont rondes, bombées, blanches, finement ridées, très visqueuses et adhèrent fortement à la gélose.

Sur bouillon, ce germe forme un voile effiloché qui flotte en surface.

Gélatine non liquéfiée.

Lait tournesolé : légèrement réduit, ni coagulé, ni digéré.

Glucides : non fermentés.

Nitrates réduits en nitrites.

Pas d'acétoïne, de SH₂ ou d'indole, mais production de NH₃.

Uréase négative.

Ces caractères font entrer notre souche dans l'espèce *Achromobacter sewerini* (Bergey et al., 1923), qui a été réétudiée par J. Brisou en 1958. La seule différence avec notre souche est bien, là encore, l'absence de culture à 37° C.

Genre *Acinetobacter*.

Ce genre sépare les *Achromobacter* immobiles des *Achromobacter* vrais, mobiles.

Nous en avons isolé deux souches dans les lacs du Ruwenzori.

Souche 24/8 bl.

Ce sont des bâtonnets irréguliers, à bouts ronds, souvent étranglés en leur moitié, parfois très courts, donnant un aspect coccoïde de 2,5 à 6 μ de long sur 0,7 μ de large. Ils sont immobiles, aciliés, non sporulés, Gram-négatifs.

Aérobies stricts, ne se cultivant pas à 37° C (opt. 28° C).

Colonies rondes, blanches, uniformes, très convexes, visqueuses lorsqu'elles sont jeunes et dures en vieillissant.

Pas de culture sur bouillon VF.

En eau peptonée et bouillon pdt, le germe forme un trouble uniforme et un sédiment blanc, sans pellicule.

Gélatine non liquéfiée.

Lait tournesolé : alcalin, caséine complètement digérée sans coagulation.

Glucides : non attaqués.

Nitrates : non réduits en nitrites.

Pas d'indole, d'acétoïne ni de SH_2 , mais NH_3 sur pdt-l.

Uréase négative.

Selon la classification américaine, nous aurions là le germe *Alcaligenes* avec l'espèce *metacaligenes*. Mais, comme l'ont démontré Brisou (130) et A.-R. Prévot, le genre *Alcaligenes* n'a pas lieu d'être individualisé. Notre germe rend donc dans le genre *Acinetobacter* avec l'espèce *metacaligenes* (Bergey) nv. comb. Brisou, 1958. Nous avons une espèce strictement adaptée au sol, puisqu'elle ne pousse pas sur milieux à base de viande.

Souche 12/14 (lac Vert Ruwenzori) et G. a. (terre D4 acide).

Bâtonnets droits, réguliers, immobiles, à bouts ronds, isolés, de 1,4 à 3,5 μ de long sur 0,7 à 0,9 μ de large, parfois en longs filaments. Ils sont immobiles, aciliés, Gram-négatifs, asporulés. La souche G. a. montre, dans les vieilles cultures, des amas coccoïdes.

Aérobic strict, ne se cultivant pas à 37° C (opt. 28° C).

Les colonies de 2 mm de diamètre sont rondes, plates, d'un blanc sale, translucides et visqueuses.

Sur bouillon, paraissent d'abord un trouble léger et une pellicule qui flotte en surface.

La souche G. a. ne forme qu'un anneau en surface du liquide.

La gélatine est liquéfiée lentement.

Lait tournesolé : légèrement acidifié et coagulé puis, petit à petit, digéré. La souche G. a. alcalinise peu le lait.

Glucides : seul, le glucose est fermenté (faiblement).

Nitrates : non réduits en nitrites.

Pas de SH_2 , d'acétoïne, d'indole ni de NH_3 (G. a. : NH_3 +).

Uréase négative.

C'est *Acinetobacter butyri* (Bergey) nv. comb. Brisou et Prévot, 1954, qui possède les caractères principaux de notre souche (fig. 15 bis).

Les cinq souches que nous venons d'étudier sont toutes des germes

typiques du groupe *Achromobacter-Acinetobacter*, peu glucidolytique, très aérobies.

Dans ces genres, aucun germe n'avait été décrit comme pectinolytique, du fait que la pectinolyse n'avait pas été étudiée au sein de ce groupe. Mais il n'est pas étonnant que ces Bactéries possèdent de telles enzymes, car, comme le montre J. Brisou, les *Achromobacteres* sont souvent des germes naturels du sol et des eaux ; les souches que nous avons isolées sont toutes bien adaptées au sol ; leur culture est capricieuse et, si on ne les repique pas tous les mois, elles meurent rapidement, même au frigidaire. Seule, la lyophilisation nous a permis la conservation de trois des souches décrites, les souches 24/8 et 118/A étant mortes.

ORDRE III. — Spirillales.

Famille I. — VIBRIONACEÆ.

Spirillales incurvées en virgule, Gram-négatives, mobiles, aérobies et anaérobies.

Genre *Vibrio*.

L'unique souche du genre (24/40 du lac Noir) est un vibrion typique, avec ses bâtonnets courts, incurvés en virgule, isolés, mobiles par un cil polaire très court et épais, asporulés, Gram-négatifs (fig. 16).

Bactérie aérobie stricte ne se cultivant pas à 37° C (opt. 28° C).



1 μ

FIG. 16.

Vibrio piget n. sp.

Sur gélose, ses colonies sont rondes, régulières de 1-2 mm de diamètre, très bombées, jaune orange, de consistance pâteuse.

Sur bouillon, elle forme d'abord un trouble léger, uniforme ; ensuite, une fine pellicule jaunâtre, flottante.

Gélatine : non liquéfiée.

Lait tournesolé : inchangé.

Glucides : non fermentés.

Cellulose : non attaquée (4 mois).

Nitrates : non réduits en nitrites.

Ne produit pas de SH_2 , d'acétoïne, d'indole ni de NH_3 .

Uréase : négative.

La pectine n'est que très faiblement attaquée ; aussi n'avons-nous pas pu préciser les enzymes de la pectinolyse.

La culture est très capricieuse et le germe meurt très vite si on ne le repique pas régulièrement.

Il ne peut appartenir au genre *Cellvibrio* ni au genre *Cellfalcicula* puisqu'il n'attaque pas la cellulose. C'était pourtant, de prime abord, la place qui lui convenait, d'après sa pigmentation. Il se classe dans le genre *Vibrio*. Parmi les espèces non glucidolytiques, nous connaissons : *V. cuneatus* et *V. percolans*, le premier digère la gélatine, le second est blanc. Nous avons donc tout lieu de croire que notre germe n'a pas encore été décrit. Nous le nommerons :

Vibrio piger nv. sp.

CONCLUSIONS AU CHAPITRE II

Nous avons pu ranger les souches pectinolytiques aérobies et asporulées dans des genres bien déterminés et connus. La plupart des souches se classent dans la famille des *Pseudomonadaceæ* : sauf une, très peu pectinolytique, qui est une *Vibrionaceæ*. Dans le genre *Pseudomonas*, caractérisé par des bâtonnets Gram-négatifs, mobiles et sécrétant des pigments verts ou bleus, 16 souches ont été étudiées. Elles peuvent s'identifier à 5 espèces classiques mais dont on ne connaissait pas encore l'activité pectinolytique. Il s'agit de « *Ps. sauromali* (1 souche), *Ps. boreopolis* (2 souches), *Ps. fairmountensis* (2 souches), *Ps. schuytkillensis* (9 souches + 1 variété) et *Ps. putida* (1 souche), des intestins de la saupe. Dans le genre *Flavobacterium*, nous n'avons isolé aucune souche ; par contre, de très nombreuses, dans le genre *Empedobacter* (*Flavobacterium* immobiles). L'activité pectinolytique de celui-ci était connue, grâce à la récente découverte de Dorey sur *Flavobacterium pectinovorum*. Nous avons vu que ce germe rentre dans le groupe des *Empedobacter*, car il est immobile.

Les 50 souches d'*Empedobacter* se répartissent au sein de 9 espèces parmi lesquelles 4 sont nouvelles et que nous avons décrites au cours de cette étude. 23 souches sont des *Empedobacter pectinovorum* (nv. comb.) ; 13 autres sont attribuées à *E. aquatile*, pour lequel on ne connaissait pas de propriétés pectinolytiques. Il en est de même pour *E. dormitator* (4 souches), *E. balustinum* (1 souche) et *E. estero-aromaticum* dont l'unique souche est une variété (var. *viscosa*). Les espèces nouvelles sont : *E. arundineti* (1 souche), *E. radicum* (4 souches), *E. exile* (1 souche) et *E. viride* (1 souche).

Le genre *Xanthomonas* nous a livré une souche qui peut se rattacher à l'espèce bien connue : *X. vascularum*. Nous en avons fait une variété nouvelle : *palustris*, à cause de la production de SH_2 et de NH_3 .

Les *Pseudomonadaceæ* non pigmentées, avec les genres *Erwinia*, *Achromobacter* et *Acinetobacter* sont représentés par quelques souches seulement. Dans le genre *Erwinia*, nous avons isolé une souche classée comme *E. betivora*.

Aucun travail n'avait, jusqu'ici, mentionné l'activité pectinolytique des *Achromobactereæ*. Citons comme espèces isolées : *Achromobacter mariense* (1), *Achr. venenosum* (1) et *Achr. sewerini* (1). Dans le genre *Acinetobacter*, nous avons déterminé *Acin. metalcaligenes* (1), *Acin. butyri* (2).

Vibrio piger nv. sp. est le seul germe isolé n'appartenant pas aux *Pseudomonadaceæ*. Ne digérant pas la cellulose, il ne peut se placer dans le genre *Cellovibrio*. Il est très peu pectinolytique.

CHAPITRE III

EUBACTÉRIES SPORULÉES OU SPORULALES

ORDRE I. — *Bacillales*.

Famille I. — *BACILLACEÆ*.

Genre *Bacillus*.

Bâtonnets droits, Gram-positifs, mobiles, cils péritriches, endospores ne gonflant pas le corps bacillaire.

Dans ce genre, 50 souches ont été isolées : 25 européennes et 25 du Ruwenzori, qui correspondent à la description suivante :

Ce sont des bâtonnets de 0,7 à 0,8 μ de large, sur 3-5 μ de long, droits, à bouts ronds, isolés ou en paires. Gram-positifs, très mobiles quand ils sont jeunes, ciliation péritriche.

Sur des cultures plus âgées, on observe des endospores abondantes très réfringentes en contraste de phase, le plus souvent centrales, parfois subcentrales. Lorsqu'elles sont bien développées, elles prennent toute la largeur ou presque du corps bactérien, mais ne le déforment jamais. Les spores libérées rapidement sont cylindriques, à bouts ronds, à parois minces, ne se colorant que faiblement, de 0,7 à 0,8 μ de large sur 1,5 à 1,8 μ de long (fig. 17).

Aérobie strict, se cultive bien à 37° et à 28° C, pas à 55° C.

Les colonies sur gélose pdt-l sont rondes, lisses, plates, blanches, légèrement ridées, mais s'étalent rapidement. Si l'on ensemence toute la surface de la gélose, il se forme une culture blanche visqueuse, qui coule, en formant des rides et des replis vers le bas du tube. La culture est alors plus sèche et correspond à un stade de sporulation.

Sur eau peptonée ou bouillon : trouble léger ; très vite apparaît une pellicule sèche, ridée et entière, qui adhère à la paroi du tube.

Bouillon + NaCl 7 % : culture positive mais sans voile.

Gélatine : liquéfiée.

Lait : d'abord légèrement coagulé ; la caséine est ensuite complètement digérée.

Lait tournesolé : alcalinisé.

Sérum de Loeffler : digéré et liquéfié.

Glucides : lévulose, glucose, saccharose, maltose, amidon, glycérine, xylose, arabinose attaquée ; non attaqués : lactose, galactose.

Citrates utilisés.

Nitrates : réduits en nitrites.

SH₂, acétoïne, NH₃ produits, pas d'indole.

Cette description correspond exactement à l'espèce-type de ce genre : le classique *Bacillus subtilis* (fig. 17).

A part quelques légères variantes, toutes les souches se montrent identiques : 2 souches ont un voile perforé de trous ; quelques-unes sont colorées faiblement en rose ; enfin, les glucides sont attaqués, d'une manière plus ou moins forte, par les différentes souches.

Des intestins de la saupe, nous avons isolé 3 souches (163, 14, 168) pectinolytiques, qui nous semblaient voisines de *B. subtilis* et s'en différencient cependant par quelques caractères précis.

Ce sont des bâtonnets minces (0,5-0,6 μ) sur 3 μ de long, droits, à bouts ronds, isolés, avec une spore centrale ou subcentrale ne déformant pas le corps microbien. Les spores sont petites, cylindriques, à bouts ronds de 0,4 μ de large sur 1 μ de long.

Le germe est mobile par cils péritriches. Gram-positif en tout début de culture, mais qui devient rapidement Gram-négatif.

Les colonies sont rondes, de 2 mm de diamètre, plates avec de petites nodosités disséminées régulièrement. L'ensemencement entier de la gélose donne un étalement blanc de consistance crémeuse, qui se plisse légèrement et finement. Le germe n'envahit pas toute la surface comme *B. subtilis* mais, comme celui-ci, forme d'abondantes spores qui sont rapidement libérées (gélose pdt-1).

Il est aérobic strict, cependant on observe une légère culture en gélose profonde, 5 jours après l'ensemencement, lorsque celle-ci est un peu aérée ; en bouillon scellé, sous vide, on ne remarque aucune culture.

Il pousse bien à 37° C et donne encore une croissance abondante à 55° C. Il se cultive bien en présence d'eau de mer.

Eau peptonée : faible trouble.

Bouillon : trouble abondant, puis formation d'une pellicule blanche, mince, uniforme, non plissée, adhérent à la paroi du tube.

Gélatine : liquéfiée avec lenteur.

Lait tournesolé : réduit par le haut, faiblement coagulé et digéré peu à peu.

Sérum de Loeffler : lentement liquéfié et complètement digéré.

Glucides : lévulose, glucose, glycérine faiblement attaqués sur milieu minéral et eau peptonée. Amidon, xylose, arabinose, lactose, maltose, saccharose, galactose, non attaqués.

Hydrolyse de l'amidon : négative.

Citrates : non utilisés.

Nitrates : réduits en nitrites.

Production d'acétoïne et de SH_2 , pas d'indole.

Uréase : négative.

Si nous parcourons la liste des *Bacillus* décrits, nous trouvons *B. lichiformis* ; mais celui-ci se cultive très bien sur bouillon scellé sous vide. *Bacillus pumilus*, *coagulans*, *badius*, *lentus* ne réduisent pas les nitrates en nitrites. Reste *B. firmus* qui ne produit pas d'acétoïne et ne pousse pas à 50° C. Aucun de ces germes ne coïncidant avec la description de notre souche, nous avons pensé considérer celle-ci comme une variété de *B. subtilis*, auquel elle ressemble le plus par la forme de ses cultures et ses caractères généraux. Cependant, les caractères suivants différencient notre souche de ce germe : il est moins protéolytique (sérum, caséine et gélatine sont attaqués plus lentement), peu glucidolytique, n'hydrolyse pas l'amidon, n'utilise pas les citrates, se cultive bien à 55° C ; de plus, sur le plan de la pectinolyse, nous avons mis en évidence une pectine-méthylestérase (très forte) que ne possède pas *B. subtilis*. Enfin, il ne sécrète ses enzymes pectinolytiques qu'en présence de pectine ; elles sont donc adaptatives alors que celle de *B. subtilis* sont constitutives.

Toutes ces différences, dont quelques-unes sont majeures séparent nettement nos souches de *B. subtilis*. Aussi croyons-nous qu'il s'agit d'une espèce nouvelle. Nous la nommerons :

Bacillus salpæ nv. sp.

Les terres de jardins nous ont livré deux souches de *Bacillus* (PpS5, PpSa) dont voici les traits principaux : bâtonnets plus petits que *B. subtilis*, de 3-5 μ de long sur 0,6-7 μ de large, avec spore centrale ou subcentrale ne déformant pas le corps bactérien. La spore elle-même est cylindrique, de 1 à 1,5 μ de long sur 0,6 μ de large, avec parois minces et peu colorables.

Bâtonnets mobiles, Gram-positifs.

Aérobies stricts, avec culture optima à 37° C.

Les colonies sur gélose inclinée pdt-I sont rondes, très plates et minces, d'un blanc crème, non visqueuses.

Sur bouillon, se forment, d'abord, un trouble moyen, puis une fine pellicule en surface.

Gélatine liquéfiée.

Lait tournesolé : acidifié, coagulé et digéré.

Glucidolyse ; lévulose, galactose, glucose, saccharose, lactose, glycérine fermentés ; maltose, amidon non attaqués.

Citrates utilisés comme seule source de carbone.

Nitrates non réduits en nitrites.

SH₂ et NH₃ sont produits ; pas d'indole, traces d'acétoïne.

Uréase négative.

Le germe se distingue de *B. subtilis* et de *B. salpæ* par la réduction des nitrates. Il rentre donc dans l'espèce bien connue de *Bacillus pumilus* ; les caractéristiques de nos souches coïncident avec ce germe.

La souche S19, isolée d'une saupe (intestin) est un gros bâtonnet sporulé, à bouts carrés, qui, par son aspect, ressemble à *Bacillus megatherium* (1,3 µ de large). Les bâtonnets sont rarement isolés, mais groupés en chaînettes ; la longueur des individus est très variable : les plus petits ont 3 µ, beaucoup vont jusqu'à 10 µ ; dans les cultures sur bouillon, on ne voit plus que de longs filaments incrustés de globules de graisse et de bourgeons latéraux ; spores à bouts carrés, de 1-1,2 µ de large sur 2-3 µ de long (fig. 18). Gram-positifs, devenant rapidement

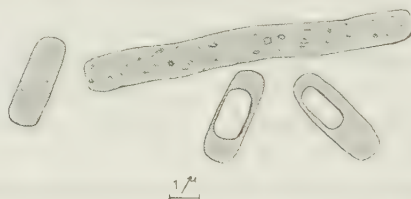


FIG. 18. — *Bacteridium capillosum* n. sp.

négatifs ; immobiles et aciliés. Les deux derniers traits distinguent cette souche des formes normales de *megatherium* ou de *cereus*. Toutefois, le *Manuel* de Bergey mentionne des variations à bouts carrés, avec filaments longs et bourgeonnants, non mobiles et Gram-variable, qui ressemblent exactement à notre germe. Il n'y aurait donc pas lieu de séparer S19 de *Bacillus megatherium* quant à la morphologie.

S19 est aérobic strict, se cultivant bien à 37° C ; pas de culture à 55° C.

Les colonies sont rondes, jaune crème, plates, à bords légèrement plus épais, se détachant du support comme un morceau de papier mouillé.

Sur eau peptonée et bouillon pdt-1, un voile sec se forme, sans trouble aucun.

Pas de culture sur VF.

Gélatine liquéfiée.

Lait tournesolé : réduit par le haut. Digéré lentement (2 mois).

Glucides : lévulose, glucose, saccharose, lactose, maltose, amidon, glycérine attaqués.

Citrates non utilisés comme seule source de carbone.

Nitrates non réduits en nitrites.

Pas d'acétoïne, ni d'indole.

Notre souche diffère de *megatherium* par l'absence de croissance sur VF, la culture en forme de voile, sans trouble, la non-utilisation des citrates. Nous pourrions en faire une variété de cette espèce, mais selon la terminologie française les Bactéries sporulées, avec spores ne déformant pas le corps microbien, Gram-positives, immobiles et aciliées, appartiennent au genre *Bacteridium*. Il n'y a donc pas lieu de maintenir S19 à l'intérieur du genre *Bacillus*. L'espèce-type du genre *Bacteridium* est *B. anthracis*, qui se différencie entre autres de S19, par la réduction des nitrates et la non-fermentation du lactose. Quatre espèces sont thermophiles (*viridulum*, *thermocellulolyticum*, *pepo*, *stearotherophilum*). Il reste 7 autres espèces, anciennement et mal décrites. A cause des données insuffisantes, nous ne pouvons comparer ces espèces à notre souche. Nous considérons S19 comme une espèce nouvelle :

Bacteridium capillosum nv. sp. (fig. 18).

ORDRE II. — Clostridiales.

Décrivons, maintenant, une série de souches sporulées, aérobies, dont la spore déforme très nettement le corps microbien. Si l'on se réfère au *Manuel* de Bergey, ces souches seraient classées dans le genre *Bacillus*, car la terminologie américaine n'accepte que des espèces anaérobies strictes parmi les Clostridiales ; or, la systématique française, qui se base en premier lieu et logiquement sur la morphologie, n'admet pas de sporanges renflés à l'intérieur du genre *Bacillus*.

Le genre *Bacillus* est défini, selon Cohn, comme contenant des bâtonnets non déformés par la sporulation. Nos souches seront donc classées dans les Clostridiales (spores centrales à subcentrales). Le genre *Endosporus* convient à ces souches, Gram-négatives et mobiles (fig. 19 a, 19 b).

Les souches RsK4, RsK6, PpS4b, Fch, TNF5 (de la rhizosphère et du sol) ont les caractéristiques suivantes :

Bâtonnets droits, de $0,8\ \mu$ de large sur $4-6\ \mu$ de long, isolés, à bouts ronds, sporulés ; sporange renflé, donnant au germe l'aspect typique



FIG. 19 a.

Endosporus circulans.

Vue à l'état frais, en contraste de phase.

du *Clostridium*. Spores de 0,7-0,8 μ de large sur 1,5 μ de long, ovales, à parois épaisses, subcentrales à subterminales ; germe très mobile, ciliature pérित्रiche, Gram-négatif.

Aérobie, ne se cultive pas ou très peu en bouillon désaéré et scellé sous vide. Croissance optimum à 30°, pas de culture à 55° C.

Les colonies sur gélose pdt-1 sont rondes, de tailles très différentes, plates, minces, blanches avec bords transparents.

Sur bouillon pdt-1 et eau peptonée, trouble moyen sans pellicule ; peu ou pas de culture sur VF.

Gélatine : lentement ou très lentement liquéfiée.

Lait tournesolé : peu acidifié ou pas coagulé, non digéré.

Glucides : xylose, arabinose, lévulose, galactose, glucose, saccharose, maltose, lactose, amidon, glycérine fermentés fortement, sans gaz.

Citrates : non utilisés.

Nitrates : réduits en nitrites.

Pas d'acétoïne, d'indole, ni de SH₂.

Uréase négative.

La description de ces souches correspond bien à celle de *Bacillus circulans* donnée par Bergey, mais, comme nous l'avons vu plus haut, c'est un *Endosporus*. Il s'agit donc de :

Endosporus circulans nv. comb (fig. 19 a, 19 b).

Le Manuel de Bergey, qui s'appuie sur le travail de Gordon, Clark et Smith, pense que *Bacillus circulans* comprend de nombreuses variations. Ainsi ce germe est-il décrit comme liquéfiant ou ne liquéfiant pas la gélatine, réduisant ou ne réduisant pas les nitrates en nitrites. Nous croyons qu'il y a lieu de séparer, en espèces distinctes, ces germes de même caractère mais sans gélatinase ou sans action sur les nitrates, ces deux propriétés étant majeures.

Les souches MP3, K3, M3a, Vmd5 (de différents sols) se trouvent dans ce cas. La non-réduction des nitrates en nitrites est la seule différence qui existe avec les souches d'*Endosporus circulans*. Celles-ci ne possèdent aucun équivalent suffisamment décrit auquel on puisse les rattacher. Nous en ferons une espèce nouvelle :

Endosporus humi nv. sp.

Suivent les autres germes, actuellement bien connus, qui lui ressemblent : *Clostridium alvei* nv. comb. (*Bacillus alvei* Bergey) diffère par le Gram, qui est positif dans les jeunes cellules, la caséase et la production d'acétoïne. *Clostridium laterosporum* nv. comb. (*Bacillus laterosporus* Bergey), Gram-positif aussi à l'état jeune, réduit les nitrates

et digère la caséine. *Clostridium pulvifaciens* nv. comb. (*Bacillus pulvifaciens* Bergey) peut se distinguer de la même manière que *laterosporum*. *Endosporus brevis* nv. comb. (*Bacillus brevis* Bergey) de même hydrolyse la caséine et n'attaque pas l'amidon. *Clostridium larvæ* nv. comb. (*Bacillus larvæ* Bergey) réduit les nitrates et n'attaque pas l'amidon. Enfin, les espèces nommées par Bergey : *Bacillus popillæ* et *lentimorbus*, immobiles et Gram-positifs, avec sporanges renflés, rentrent dans le genre *Inflabilis* (*Inflabilis popillæ* nv. comb., *Inflabilis lentimorbus* nv. comb.).

Les souches RL5' et K4, isolées du sol, se distinguent d'*Endosporus humi* nv. sp. par l'absence de gélatinase et d'*Endosporus circulans* pour la même raison, avec, en plus, la non-réduction des nitrates. Comme pour le germe précédent, aucune des espèces citées plus haut ne concorde avec les caractéristiques de nos souches. Nous avons ainsi une espèce nouvelle :

Endosporus multiplex nv. sp.

Les glucides étudiés (voir plus haut) sont tous fermentés mais plus faiblement que pour les deux autres espèces.

Dans le genre *Endosporus*, la souche 121C, isolée des sources chaudes (94° C) de May-Ya-Moto, reste encore à décrire. Ce sont des bâtonnets droits, flexueux (légèrement), d'aspect plutôt long et mince (0,6-0,7 μ de large sur 6-10 μ de long), mobiles, Gram-négatifs, sporulés. La spore centrale à subcentrale, ovale, à paroi épaisse, grosse (0,9 μ sur 1,5 μ) fait renfler le corps microbien irrégulièrement, car elle est placée sur le côté du bâtonnet (fig. 20). Nous avons tout de suite songé à *Clostridium laterosporum* nv. comb. (*Bacillus laterosporus* Bergey), mais d'autres caractères l'en différencient :

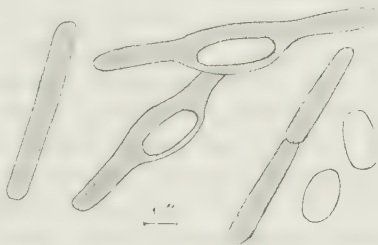


FIG. 20. — *Endosporus pravus*.

Aérobic, avec culture optimum à 37° C. Ne pousse pas à 55° C. Ne se cultive pas sous vide en bouillon. Les colonies sont rondes, blanches, petites, plates, à bords réguliers.

En eau peptonée et sur bouillon pdt-1, le germe donne un trouble moyen, uniforme, légèrement granuleux.

Pas de culture sur VF.

Gélatine : lentement liquéfiée.

Lait tournesolé : acidifié et réduit par le haut du tube, ni coagulé, ni digéré.

Glucides : xylose, arabinose, lévulose, galactose, glucose, saccharose, maltose, lactose, amidon fermentés ; glycérine non attaquée.

Citrates non utilisés.

Nitrates réduits en nitrites.

Acétoïne et indole produits.

Ce germe diffère de *laterosporum* par son Gram, l'absence de caséase, la glucidolyse (*laterosporum* ne fermente pas le lactose) et la production d'acétoïne et d'indole. Ces deux derniers traits de même que la position latérale de la spore le distinguent des trois *Endosporus* précédemment décrits. Aucune espèce connue ne lui convenant, nous proposons pour lui une espèce nouvelle :

Endosporus pravus nv. sp. (fig. 20).

Genre *Clostridium*

(se distingue du genre *Endosporus* par le Gram-positif).

Une seule espèce aérobie a été isolée dans ce genre. Les nombreuses souches qui s'y rattachent proviennent du Ruwenzori (souches 16/38, 03/9, 12/10), de sols français et d'autres substrats (une poutre pourrie, par exemple).

Ce sont des bâtonnets, Gram-positifs, mobiles, généralement isolés, de 0,7 à 0,9 μ de large sur 4-10 μ de long (moy. 4-6 μ) à bouts ronds. Lors de la sporulation, le bâtonnet enfle fortement, prenant la forme d'une navette. La spore se trouve au centre de ce renflement qui est subcentral à subterminal. Elle est grosse de 1,2-1,5 μ de large sur 2 μ de long, ovale, avec des parois épaisses (fig. 22).

Ce germe se cultive aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, avec une température optimum de 30° C. Sur gélose inclinée, les colonies sont rondes, de taille variable (0,5-2 mm de diamètre), extrêmement visqueuses, à bords réguliers, blanches, plates et translucides. En gélose profonde, les colonies sont lenticulaires ; elles brisent la gélose par le dégagement gazeux.

Sur bouillon pdt-1, on observe un trouble irrégulier en forme de fins filaments visqueux et un dégagement gazeux abondant ; ensuite, se forme un dépôt blanc qui s'élève en colonne visqueuse blanche, typique, lorsqu'on remue doucement le tube. En surface, apparaît une pellicule blanchâtre plutôt translucide, boursoufflée de bulles de gaz. pH final 4,5-5.

Bonne culture, mais moins muqueuse en bouillon VF et en eau peptonée (pas de gaz sur ce dernier).

Gélatine : lentement liquéfiée.

Lait tournesolé : acidifié, réduit, coagulé ; caillot rétracté.

Glucides : xylose, arabinose, lévulose, galactose, glucose, saccharose, maltose, lactose, amidon fermentés avec formation de gaz.

Glycérine non attaquée.

Citrates non utilisés.

Nitrates réduits en nitrites.

Acétoïne produite en grande quantité.

Sur bouillie de pommes de terre, le germe donne les produits de fermentation terminaux suivants : produits neutres : traces d'amines, alcool et cétones en grande quantité, indole en petite quantité, NH_3 (0,13 g ‰) ; produits acides : les acides acétique et formique (4 fois plus d'acétique que de formique). Pas d'acide butyrique, acide lactique.

Acidité volatile totale : 0,3 g par litre.

La bouillie de pommes de terre est digérée et réduite en une masse visqueuse avec un fort dégagement gazeux.

Toutes ces souches sont caractéristiques de l'espèce *Clostridium polymyxa* (fig. 22). La systématique américaine l'appelle *Bacillus polymyxa* ; mais nous l'avons déjà dit, le genre *Bacillus* ne peut comprendre des bâtonnets à sporanges renflés. *Clostridium polymyxa* est extrêmement répandu, ainsi que nous l'ont montré nos analyses. Lorsqu'il domine dans un substrat, on le reconnaît, d'emblée, sur milieu Vr dans lequel il se cultive sous forme d'une colonie visqueuse, blanche, typique. Il se distingue de *Clostridium macerans* par l'abondance de mucus (d'où son nom), sa température optima plus basse, la production d'acétoïne.

Passons maintenant à la description des *Clostridium* anaérobies stricts.

La souche 18/17, isolée d'une boue du Ruwenzori, se distingue de toutes nos autres souches par sa taille. C'est un très gros bâtonnet de 1,3-1,5 μ de large sur 5,5 à 8 μ de long. Gram-positif dans les cultures très jeunes (8 heures), rapidement Gram-négatif, mobile avec cils péritriches. Il est isolé et les bouts sont un peu carrés. Lors de la sporulation, le bâtonnet renfle énormément, d'une manière homogène sur toute la longueur, prenant ainsi la forme d'une saucisse. Le cytoplasme de ce bâtonnet, à l'état présporulé n'a pas de granulation. Les dimensions, à ce stade, sont de 3 à 4 μ de large sur 12 à 15 μ de long. La spore apparaît ensuite ; elle est en position subcentrale et ne prend pas toute la largeur du sporange. Elle est rapidement libérée mais des débris de sporange y adhèrent. La paroi est épaisse, sa forme plutôt cylindrique, légèrement bombée sur les côtés, à bouts carrés. Dimension : 2 μ de large sur 4,2 μ de long. Elle est donc volumineuse (fig. 23 a, 23 b).

Anaérobie strict, culture optimum à 30° C, bonne culture à 37° C.

En gélose profonde, les colonies sont rondes, lenticulaires, simples, blanches, petites (1 mm de diamètre), avec dégagement gazeux. Pas de

culture sur eau peptonée : culture sur VF seulement après passage sur milieu ep-l-g.

En bouillon pdt-1, il y a formation d'un trouble homogène blanc, avec gaz. Le trouble se dépose très rapidement, laissant le bouillon clair ; dépôt blanc.

La fermentation est brève.

Thermorésistance : 2 minutes à 100° C.

Rouge neutre, vert janus réduits partiellement et temporairement ; pas de culture sur safranine.

Gélatine ; peu à peu liquéfiée.

Lait rapidement coagulé, caillot rétracté, non digéré.

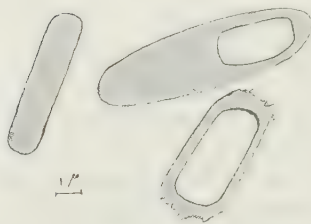


FIG. 23 a.
Clostridium grave n. sp.

Blanc d'œuf dans milieu DBM : lentement digéré (pas complètement).

Glucidolyse : xylose, arabinose, lévulose, galactose, glucose, saccharose, maltose, lactose, amidon fermentés avec gaz ; glycérine non fermentée.

Réduction des nitrates négative.

Produits de fermentation sur bouillie de pommes de terre : produits neutres : alcool et NH_3 (0,068 g par litre), pas d'amines, d'aldéhydes, de cétones, de phénol, d'indole, de crésol ou de scatole.

Acidité volatile totale : 0,73 g par litre.

Production des acides formique, acétique et butyrique dans la proportion de 1 : 3 : 5. Acide lactique présent.

Pas d'acétoïne, non uréolytique, pH final après fermentation : 4.

La bouillie de pommes de terre n'est pas décomposée.

Le germe par sa taille se rapproche beaucoup de *Clostridium pectinolyticum*. Il s'en distingue nettement par sa gélatinase. Nous ne pouvons l'identifier avec les autres pectinolytiques anaérobies incolores, qui sont beaucoup plus petits (de moitié) et produisent toujours des cétones et de l'acétoïne, au cours d'une fermentation plus intensive. Nous nommerons cette espèce nouvelle :

Clostridium grave nv. sp. (fig. 23 a, 23 b).

Les souches 05/20, 118 A, 16/49 du Ruwenzori, ainsi que celles T1, Pp12, Ber4, JL, TrE3, DE3 des boues et terres françaises, correspondent à la description suivante :

Bâtonnets droits, à bouts ronds, de 0,8 μ de large sur 4-6 μ de long, mobiles, cils péritriches ; Gram-positif, dans les premières heures de culture, devenant rapidement Gram-négatif (fig. 24 a, 24 b). Les spo-

ranges sont nettement renflés avec une spore subterminale. Il faut donc examiner plusieurs individus et l'on s'aperçoit qu'il y a toujours des formes très clostridiennes. La spore est cylindrique, à bouts un peu carrés, toujours avec des restes de sporanges, de $0,9\ \mu$ sur $2\ \mu$.

Anaérobie strict, culture optimum à 30°C , bonne culture à 37°C .

Thermorésistance faible : 5 minutes à 80°C .

Oxydoréduction : vert janus, safranine réduits définitivement ; rouge neutre réduit en partie, puis recoloré.

En gélose profonde, les colonies sont lenticulaires, simples, blanc crème, de 1 à $1,5\text{ mm}$ de diamètre ; gélose brisée par le dégagement gazeux.

Culture en bouillon pdt-1 : trouble abondant, homogène, fort dégagement gazeux, sédiment blanc.

Pas de culture sur eau peptonée.

Culture sur VF, uniquement après passage sur milieu intermédiaire.

Gélatine : liquéfiée.

Lait : coagulé ; caillot rétracté, blanc, non digéré.

Blanc d'œuf sur milieu DBM : inchangé.

Glucidolyse : xylose, arabinose, lévulose, galactose, glucose, saccharose, maltose, lactose, amidon fermentés ; glycérine non attaquée.

Nitrates non réduits en nitrites.

Produits de fermentation : aldéhydes, alcools, cétones, NH_3 ($0,068\text{ g}$ par litre), pas d'amines, ni de phénols, ni d'indole.

Acidité volatile totale : $0,57\text{ g}$ par litre, donne les acides formique, acétique et butyrique (proportion 1 : 3 : 5) et l'acide lactique. Le pH final de la fermentation est de 4,5 ; bouillie de pommes de terre digérée (lentement).

Acétoïne formée par une souche (05/20) ; ce produit disparaît, sans doute, rapidement ; pas de SH_2 ; non uréolytique.

La description de ces souches correspond à celle de *Glostridium laniganii*, qui fut isolé par Lanigan, dans les routoirs australiens (fig. 24 a, 24 b).

Toutes les souches étudiées ne sont pas rigoureusement identiques entre elles. La fermentation peut être assez vive, laissant un liquide clair ou, au contraire, troublé par les corps microbiens qui se déposent plus lentement, pour certaines souches. Enfin, la morphologie n'est pas toujours semblable : les bâtonnets et les sporanges sont d'épaisseur variable. La souche JL, par exemple, est représentée par des bâtonnets

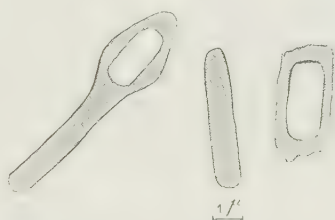


FIG. 24 a.
Glostridium laniganii.

très fins, pleins de granulations, qui dans les cultures âgées se transforment en sphères également remplies de granulations (fig. 24 c).

Le phénomène a été souvent observé chez les anaérobies, mais on ne connaît pas encore la signification de ce stade. Dans les cultures âgées de JL, on ne trouvera plus que des sphères assez grosses (3-5 μ de diamètre).

L'action des souches sur le lait et le blanc d'œuf peut aussi être différente. Pour le lait, on observera parfois une digestion (toujours faible) du caillot qui peut être plus ou moins rétracté ; de même, le blanc d'œuf est de temps en temps ramolli mais jamais franchement digéré (Pp12). Cette souche forme ainsi une transition avec l'espèce suivante :

Les souches IP4, 03/23, 74', ainsi que celles : 314 et 4259 envoyées par S. Sugama, sont très voisines des précédentes mais s'en distinguent nettement. Comme nous venons de le dire, il existe des formes de



FIG. 24 c. — *Clostridium laniganii*
souche JL.

Sphéroplaste, bâtonnets sporulés (vue
à l'état frais, en contraste de phase).

passage entre ces deux groupes. La morphologie est presque semblable ; cependant, on trouve, en général, des bâtonnets plus fins encore, mobiles, Gram-positifs, en début de culture ; le sporange est peu renflé, en forme de fuseau allongé ; la spore est petite.

Les colonies sont lenticulaires, blanches, petites.

La culture sur VF n'a lieu qu'après passage sur milieu intermédiaire bien que, comme dans le groupe précédent, certaines souches se cultivent directement sur ce milieu (VF).

Pas de culture sur eau peptonée.

Sur bouillon pdt-1 : trouble et fort dégagement gazeux.

Gélatine : rapidement liquéfiée.

Lait coagulé et digéré en 24 heures ; restent un liquide clair et un petit caillot de lait ; le stade de coagulation ne se voit généralement pas car la digestion a lieu en même temps.

Blanc d'œuf sur milieu DBM : digéré ou ramolli ; la digestion est nettement visible, au bout de 1 à 2 mois de culture.

Glicides : fermentés de la même manière que pour l'espèce précédente.

Nitrates : non réduits en nitrites.

Fermentation de la bouillie de pommes de terre : violente et longue ; bouillie digérée, pH final : 4.

Produits terminaux : aldéhydes, alcools, cétones, NH_3 (0,068 g %₁₀₀).

Les souches 314 et 4259, envoyées par Sugama, produisent, en plus, de l'indole, du scatole et une grande quantité d'acétoïne. Acidité volatile totale : 0,9 g %₁₀₀.

Les souches 4259 et 314 donnent les acides acétique et butyrique (1 : 1). Les autres souches : les acides formique, acétique et butyrique dans les proportions de 1 : 2 : 5. Acide lactique produit par toutes les souches ; pas d'acide succinique.

Non uréolytique.

Ces souches se distinguent donc essentiellement de *laniganii* par leur activité protéolytique forte : gélatine davantage liquéfiée, caséine et blanc d'œuf attaqués. Il convient de les réunir en une espèce nouvelle que nous nommerons :

Clostridium eruptens nv. sp.

On ne peut pas la confondre avec *Clostridium omnivorum* également incolore et protéolytique ; car ce dernier produit, en grande quantité, des amines qui lui confèrent une odeur nauséabonde ; de plus, il ne digère que la caséine et n'attaque pas le blanc d'œuf.

Ainsi, que nous l'avons énoncé plus haut, il existe de nombreux intermédiaires entre *Clostridium laniganii* et *Clostridium eruptens*, surtout du point de vue de la protéolyse. Certaines souches de *laniganii* peuvent digérer légèrement la caséine et ramollir le blanc d'œuf ; quelques souches de *Cl. eruptens*, tout en digérant fortement la caséine, peuvent attaquer le blanc d'œuf de façon moindre.

Nous quittons le groupe des *Clostridium* pectinolytiques anaérobies incolores, pour décrire deux souches fort intéressantes, du groupe des pectinolytiques pigmentés :

La première ATCC 824 nous a été envoyée par S. Sugama, qui l'avait lui-même reçue étiquetée, sous le nom de *Clostridium acetobutylicum*. Ce dernier est, nous le savons maintenant, classiquement défini comme non pectinolytique ; nous avons, nous-même, mesuré le pouvoir pectinolytique des souches historiques d'*acetobutylicum* de la collection du Service des anaérobies ; or, aucune des 5 souches étudiées n'était pectinolytique. La souche 824 ne peut donc rentrer que dans le sous-genre *Clostridium aurantibutyricum*. Rien ne la distingue de prime abord des souches 314 et 4259 de *Clostridium eruptens*.

Colonies blanches, lenticulaires, simples, petites, en gélose profonde. Gélatine fortement liquéfiée.

Lait coagulé et digéré.

Blanc d'œuf digéré.

Les glucides sont, cependant, moins bien fermentés ; seuls, le sont : la lévulose, le galactose, le glucose, le lactose et l'amidon.

Nitrates non réduits en nitrites.

Les produits neutres de fermentation sont à peu près les mêmes (aldéhydes, alcool, indole, scatole, pas de cétone, NH_3).

Acétoïne en grande quantité.

Acides volatils : acétique et butyrique.

Acides fixes : lactique et succinique, en quantité égale.

La production d'acide succinique ne pouvait pas, à elle seule, la faire individualiser en une espèce distincte ; mais, au bout d'une semaine de culture sur bouillie de pommes de terre en Erlenmeyer, apparaît un pigment net, vert-jaune canari. Ce pigment n'est sécrété ni dans les colonies de gélose profonde, ni dans les tubes scellés sous vide ou même ouverts. L'espèce décrite se rattache ainsi au groupe des *Clostridium* pigmentés. Elle est voisine de *Clostridium flavum*, qui ramollit le blanc d'œuf sans le digérer mais ne digère pas le lait (coagulation seulement). Il convient de considérer cette souche comme une espèce nouvelle, car nulle espèce pigmentée déjà étudiée ne possède une activité protéolytique aussi intense. Nous la nommerons :

Clostridium opertum nv. sp.

Ses traits principaux sont : pectinolytique et fortement protéolytique ; lait, gélatine, blanc d'œuf digérés ; ferment acétobutyrique avec production d'acide succinique ; pigment vert sur bouillie végétale et en présence d'air.

Les boues d'algues de Dax nous ont livré un *Clostridium* pigmenté dont voici les caractères.

Les bâtonnets sont droits, isolés ou en paires, de $0,7 \mu$ de large sur $4-6 \mu$ de long, mobiles, Gram-positifs ; lors de la sporulation, le bâtonnet gonfle, faisant place à une spore nettement subterminale à subcentrale. Ce caractère apparaît plus nettement en contraste de phase. Sur lame colorée, la spore est souvent terminale ou presque, mais conserve tout de même son aspect clostridien. Le sporange possède une protubérance nette en fer de lance, qui est très réfringente en contraste de phase. La spore libérée est cylindrique, à bouts plutôt carrés, de 1μ de large sur 2μ de long et ne se sépare pas de la protubérance en fer de lance du sporange (fig. 25 a, 25 b).

C'est un anaérobie strict, à croissance optimum à 30°C ; il se cultive aussi à 37°C .

Les colonies sont, d'abord, lenticulaires, deviennent de plus en plus ouatées et grossissent. Le pigment est jaune-vert canari et, contraire-

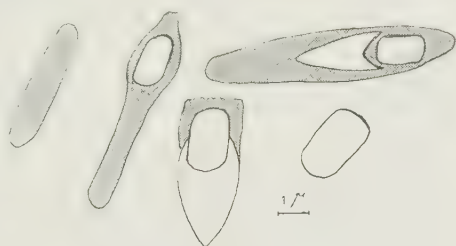
ment aux cultures liquides, reste toujours de cette couleur. Il ne pousse pas sur bouillon de viande, même après passage répété sur milieu de transition et ensemencement massif.

Sur bouillon pdt-1 et bouillie, il donne un trouble homogène et du gaz avec un culot jaune-vert canari qui, au bout d'une semaine ou deux, vire à l'orangé. Le pigment ne noircit pas à l'air. Maximum de pigment à 30° C. Peu de pigment à 37° C. Quinze jours environ après l'arrêt de la culture, celle-ci reprend lentement à l'intérieur du tube, sans dégagement gazeux en surface du liquide, en un trouble légèrement jaunâtre (il ne s'agit pas d'une souillure).

Gélatine liquéfiée rapidement.

Lait fortement coagulé devenant jaune-vert puis orange.

FIG. 25 a. — *Clostridium felsineum* var. *flavum*
(d'après une vue en contraste
de phase).



Blanc d'œuf DBM : ramolli.

Glucidolyse : lévulose, galactose, glucose, saccharose, maltose, lactose, amidon fermentés ; glycérine non attaquée.

Nitrates réduits en nitrites.

Produits terminaux de fermentation : produits neutres : NH_3 (0,17 g %).

Alcools, cétones, acétoïne. Produits acides : les acides acétique, butyrique (1 : 1), lactique et succinique. Acidité volatile totale : 2,4 g %.

pH final de la fermentation : 4,5.

Nous croyons pouvoir l'identifier à une variété de *Clostridium felsineum*. En effet, ce dernier produit un pigment qui, d'emblée, est franchement orangé. Le pigment de notre germe semble identique à celui de *Cl. haumannii*, vert-jaune et ensuite orangé. *Cl. haumannii* n'est cependant pas gélatinolytique. *Cl. flavum* ne convient pas non plus car son pigment reste jaune canari ; ses spores sont longues et le sporange ne forme pas de protubérance. Nous nommerons cette souche :

Clostridium felsineum var. *flavum* nv. var. (fig. 25 a, 25 b).

Ceci nous montre combien les *Clostridium* pigmentés et pectinolytiques sont voisins les uns des autres.

Nous résumerons dans le tableau XI la classification de nos souches de *Clostridium* pectinolytiques.

TABLEAU XI. — Classification des *Clostridium* pectinolytiques isolés.

L + G + O +	L + G + O —	L + G — O —	L + G — O +	L — G + O +	L — G + O —	L — G — O +	L — G — O —
<i>Cl. eruptens</i> n. sp. Blanc 5 souches	<i>Cl. omnivorum</i> + amines o souche			<i>Cl. grave</i> n. sp. Blanc d'œuf peu digéré grande taille. 1 souche	<i>Cl. laniganii</i> 10 souches		<i>Cl. pectino- lyticum</i> Grande taille o souche
<i>Cl. opertum</i> n. sp. Jaune tar- dif. 1 souche				<i>Cl. felsineum</i> var. <i>flavum</i> nv. var. Pigment vert puis orange, blanc d'œuf ramolli. 1 souche			

L + ou — lait digéré ou non (toujours coagulé).

G + ou — gélatine digérée ou non.

O + ou — blanc d'œuf digéré ou non.

La digestion du blanc d'œuf est très lente pour toutes les espèces. Il faut compter un minimum de 1 à 2 mois pour un résultat net en milieu DBM.

ORDRE III. — Plectridiales.

Avant d'aborder les souches anaérobies strictes, il nous faut décrire un germe aérobie strict de ce groupe (souche Cpr6 du sol).

C'est un bâtonnet de 0,7 μ de large sur 6 μ de long, très mobile, Gram-négatif ; la spore est rigoureusement terminale, donnant au sporange l'aspect typique plectridien. Jeune, elle est ovale et devient tout à fait ronde. Ces caractères nous conduisent déjà au genre *Terminosporus* (fig. 21).

Ce germe est aérobie strict, ne se cultivant pas en bouillon scellé sous vide ; la croissance optima a lieu à 30° C ; pas de culture à 55° C.

Les colonies sont rondes, blanches, plates, de 2 à 3 mm de diamètre, de consistance plutôt sèche.

Il ne pousse pas sur VF. Sur bouillon pdt-I et eau peptonée, il forme un trouble homogène, sans dégagement gazeux.

Gélatine : non liquéfiée.

Lait : non coagulé ni digéré, alcalin.

Glucides : non attaqués.

Citrates : non utilisés.

Nitrates : non réduits en nitrites.

Pas de production d'acétoïne, de SH_2 , d'indole et de NH_3 .

Non uréolytique.

La description de cette souche correspond à un germe très classique et répandu nommé *Bacillus sphæricus*, selon la terminologie américaine. Mais cette espèce ne peut être classée comme *Bacillus* car elle est Gram-négative. Sa spore est franchement terminale ; c'est une Plectridiale. Le genre *Terminosporus* réunit les espèces Gram-négatives et mobiles. Nous aurons la combinaison nouvelle :

Terminosporus sphæricus nv. comb. (fig. 21).

Germes anaérobies stricts.

Les souches isolées, très nombreuses, sont identiques entre elles. 25 souches proviennent du Ruwenzori ; une dizaine des terres françaises.

Ce sont de petits bâtonnets, un peu ovales, à bouts arrondis, isolés ou en paires, de 0,8 μ de large sur 2 à 3 μ de long. Ils sont mobiles, Gram-positifs en début de culture, Gram-négatifs dans les cultures plus âgées.

Lors de la sporulation, seul, le bout du bâtonnet renfle en protubérance ronde. Ce sporange rond et terminal contient ensuite une spore ronde ou ovale, de 1 μ de diamètre environ, qui se libère bientôt. Le sporange persiste sur un côté de la spore, ce qui donne l'impression d'une paroi à épaisseur variable (fig. 26). Ces caractères nous conduisent au genre *Plectridium*.

Anaérobie strict, optimum de croissance : 30° C, pousse mal à 37° C.

Le vert janus est réduit. Pas de culture en présence de safranine et de rouge neutre.

Thermorésistance : 5 minutes à 80° C.

Les colonies en gélose profonde sont petites, rondes, lenticulaires, simples, blanches.

Il s'adapte sur VF, après passage sur milieu intermédiaire ; certaines souches se cultivent même directement sur ce milieu. Pas de culture sur eau peptonée. Sur bouillon pdt-1, il forme un trouble uniforme avec dégagement gazeux moyen ; dépôt blanc non visqueux.

La gélatine est faiblement et très lentement liquéfiée.

La gélatinase des souches du Ruwenzori ne peut être mise en évidence que par la technique de Kohn.

Lait : coagulé, peu digéré.

Blanc d'œuf (DBM) non attaqué.

Glucidolyse : xylose, arabinose, lévulose, galactose, glucose, saccharose, maltose, lactose, amidon fermentés (ce dernier faiblement).

Glycérine non fermentée.

Nitrates non réduits en nitrites.

Sulfites réduits en sulfures.

SH₂ positif.

Produits terminaux de fermentation : produits neutres : aldéhyde (peu), alcool et NH₃ (0,068 g %), pas de cétone, d'amine, de phénol ni d'indole.

Acidité volatile totale : 0,4-0,5 g % . Acides formique et acétique (1 : 3). Pas ou très peu de butyrique.

Acide lactique toujours présent.

Pas d'acétoïne.

Le pH de la bouillie est abaissé à 5 ; la fermentation est peu vigoureuse ; la bouillie de pommes de terre n'est pas attaquée.

Toutes ces souches peuvent, sans aucun doute, se rattacher à *Plectridium pectinovorum*, germe à spore terminale, peu protéolytique (fig. 26).

Cependant, il est surprenant qu'aucune de nos souches ne produise d'acide butyrique, fait contradictoire avec la description classique de ce germe (d'après les différents travaux, on constate toutefois que l'acide acétique domine ; concentration de 5 : 1 d'après Raynaud). Pour tenter d'élucider le problème, nous avons comparé nos souches à celles : PC, Braz 1, PJ de la collection du Service des anaérobies. La souche PC, qui est un mutant à petites colonies de la souche historique, et la souche Braz 1, isolée de l'Hibiscus, étaient morphologiquement et biochimiquement identiques aux nôtres : petit germe légèrement ovale, pas d'acide butyrique produit. La souche PJ, au contraire, déterminée comme *pectinovorum* par Weizmann et Hellinger (1977), est un gros bâtonnet (de 10 à 15 μ de long sur 0,8 μ de large), ayant toutes les caractéristiques du *Plectridium*, mais différant par sa morphologie de PC et Braz 1 (grande taille, grosse spore ovale). De plus, au cours de la fermentation, elle produit les acides acétique et butyrique (1 : 3) et ramollit le blanc d'œuf en milieu DBM. La bouillie de pommes de terre est réduite en un amas mucilagineux et complètement digérée, le pH est abaissé à 4. PJ est microaérophile car, lorsqu'on ensemence des géloses inclinées abondamment avec l'anse, les traces de germes laissées sur la gélose se développent, formant de gros amas mucilagineux blancs. D'ailleurs, l'activité pectinolytique de la souche est faible (beaucoup plus faible que les souches classiques).

Nous pensons que la souche PJ est à individualiser comme variété du germe classique. Nous la nommerons :

Plectridium pectinovorum var. *butyricum* nv. var.

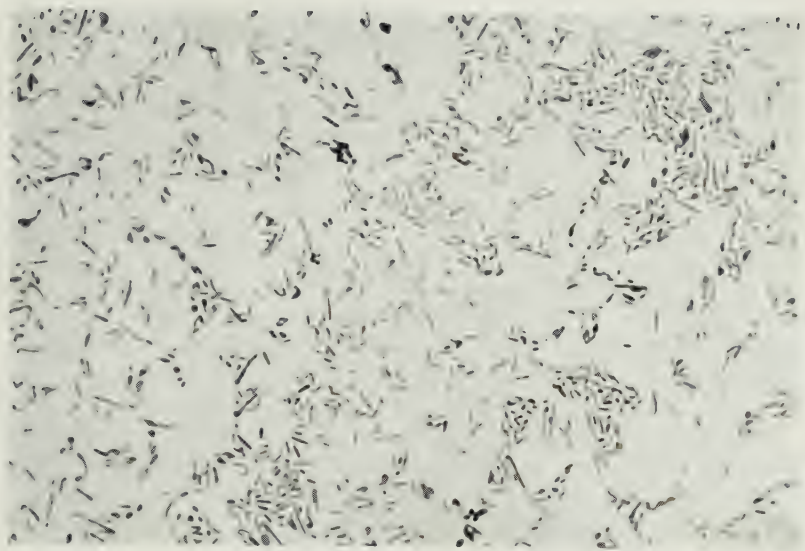


FIG. 13. — *Empedobacter pectinovorum* ($\times 1\,300$).



FIG. 14. — *Empedobacter radicum* ($\times 1\,300$).



FIG. 15 bis. — *Acinetobacter butyri* ($\times 1\,300$).



FIG. 17. — *Bacillus subtilis* ($\times 1\,300$).



FIG. 19 b. — *Endosporus circularans* ($\times 1300$).

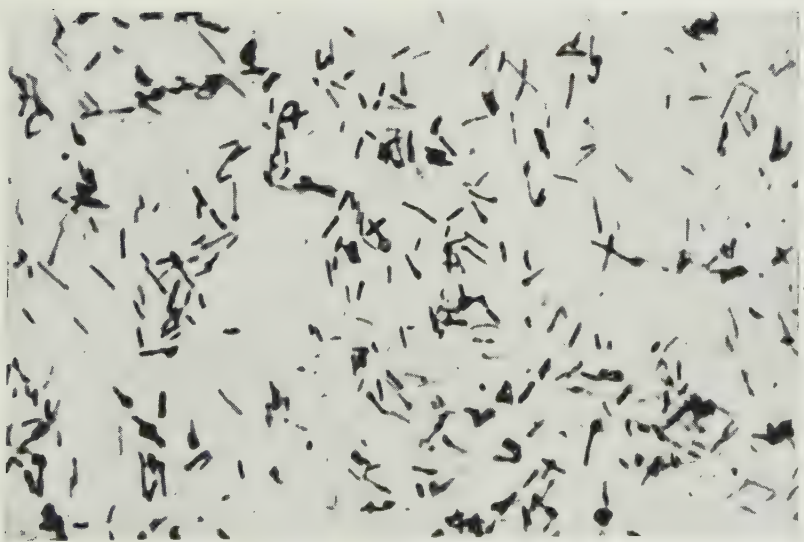


FIG. 21. — *Terminosporus sphaericus* ($\times 1300$).



FIG. 22. — *Clostridium polymyxa* ($\times 1\ 300$).

Les spores se colorent aussi par la fuchsine ; à gauche, des spores libres.



FIG. 23 b. — *Clostridium grave* ($\times 1\ 300$).



FIG. 24 b. — *Clostridium laniganii* ($\times 1\,300$).

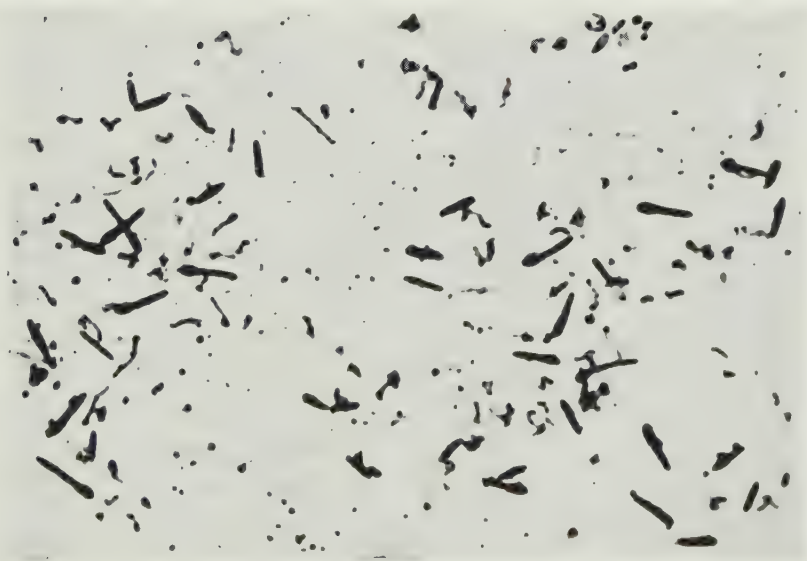


FIG. 25 b. — *Clostridium felsineum* var. *flavum* ($\times 1\,300$).



FIG. 26. — *Plectridium pectinovorum* ($\times 1300$).

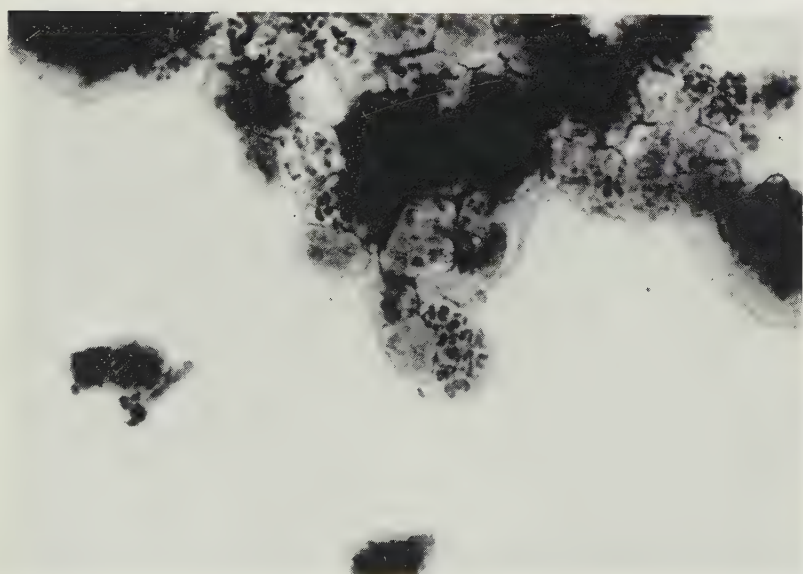


FIG. 27 b. — *Angiococcus disciformis* ($\times 1000$).

CONCLUSIONS AU CHAPITRE III

Les Sporulales se divisent en trois ordres, suivant la forme et la place du sporange. Non déformé, central à subterminal : *Bacillales* ; renflé, central à subterminal : *Clostridiales* ; renflé rigoureusement terminal : *Plectridiales*. Ces trois grands groupes renferment, chacun, de nombreuses espèces pectinolytiques dont l'étude systématique est fort intéressante. Parmi les *Bacillales*, quatre de ces espèces ont été reconnues. Il s'agit, d'abord, du classique *Bacillus subtilis* ; nous en possédons 50 souches. Trois souches sont voisines de ce germe, mais s'en distinguent toutefois par quelques caractères majeurs. Nous les avons considérées comme une espèce nouvelle :

Bacillus salpæ nv. sp. (isolé dans les intestins de la saupe).

Bacillus pumilus nous a fourni 2 souches qui correspondent bien à la description classique. Une souche d'un gros bâtonnet isolé de la saupe aurait pu, selon la conception de Bergey, s'intégrer dans l'espèce *Bacillus megatherium* ; mais, notre souche étant immobile et aciliée, rentre, suivant la nomenclature française, dans le genre *Bacteridium*. C'est une espèce nouvelle nommée :

Bacteridium capillosum nv. sp.

Parmi les *Clostridiales*, les souches se classent dans 2 genres principaux : *Endosporus*, qui ne comprend que des germes aérobies, et *Clostridium*, dans lequel les souches anaérobies stricts dominent. Les germes que nous reportons dans le genre *Endosporus* seraient, selon le principe américain, classés dans les *Bacillus*. Nous avons ainsi fait une combinaison nouvelle de *Bacillus circulans* qui s'appellera :

Endosporus circulans (5 souches).

Nous formons des espèces nouvelles avec les souches qui ne diffèrent de ce germe que par la réduction des nitrates ou l'absence de gélatinase (Smith prétend que l'on peut, sous le nom de *circulans*, classer toutes sortes de variétés). Les deux espèces nouvelles sont *E. humi* (nitrates + (4 souches) et *E. multiplex* (gélatine —) (2 souches). Une souche possède des spores qui déforment latéralement le corps microbien. Elle se distingue cependant de *Clostridium laterosporum* nv. comb. (*Bacillus laterosporus* Bergey) par de nombreux caractères majeurs. Nous avons une espèce nouvelle nommée *Endosporus pravus* nv. sp.

Les *Clostridium* comprennent de nombreuses souches de *Clostridium polymyxa*, anaérobie facultatif. Les autres souches isolées se classent surtout parmi les pectinolytiques stables et incolores. Décrivons, en premier lieu, une espèce nouvelle :

Clostridium grave qui se distingue des autres germes, surtout par sa grande taille. 10 souches sont identifiées à *Clostridium laniganii*. 5 autres ont la même morphologie, mais sont très protéolytiques (lait et blanc d'œuf digérés). Nous les avons individualisées en une espèce nouvelle :

Cl. eruptens nv. sp.

Nous pensons qu'il existe de nombreux intermédiaires entre ces deux espèces. Elles se distinguent de *Cl. omnivorum* par la digestion du blanc d'œuf et par l'absence de production d'amines. Rappelons ici, que mises à part les enzymes de la pectinolyse, les *Clostridium* gazo-gènes et incolores possèdent souvent toutes les propriétés de *Clostridium acetobutylicum*. Aussi, de nombreux auteurs sont-ils tentés de ranger des espèces pectinolytiques parmi celle-ci. *Cl. acetobutylicum*, rappelons-le, a été défini comme non pectinolytique ; d'ailleurs, les souches historiques du Service des anaérobies ne le sont pas. D'autre part, les enzymes de la pectinolyse sont des enzymes majeures et font que les *Clostridium* pectinolytiques se rangent dans le sous-genre qui leur est destiné : *Clostridium aurantibutyricum*.

Rien ne distinguait, tout d'abord *Cl. eruptens* n. sp. de la souche ATCC 824. Mais celle-ci produit tardivement un pigment vert-jaune dans des conditions bien déterminées. Nous l'avons nommée :

Cl. opertum nv. sp.

Une deuxième souche a retenu notre attention parmi les *Clostridium*. Il s'agit d'une nouvelle variété de *Cl. felsineum* : *flavum* ; en effet, *felsineum* donne, d'emblée, un pigment orange alors que notre souche se pigmente de la même manière que *Cl. haumanni* (vert-jaune et ensuite orange).

Les *Plectridiales* comprennent, surtout, l'espèce *Plectridium pectinovororum* (35 souches). La souche PJ de Weizmann diffère nettement des 35 autres, par la production d'acide butyrique et sa plus grande taille. Nous l'avons individualisée en variété *butyricum*. Dans cet ordre, une seule souche est aérobie et correspond à la définition de *Bacillus sphaericus*. Or, ce germe rentre dans le genre *Terminosporus* car la spore est terminale et le bâtonnet Gram-négatif. Nous aurons la combinaison nouvelle :

Terminosporus sphaericus.

CHAPITRE IV

MYXOBACTÉRIALES

Le lac Catherine (17/50) et le lac Vert (12/32) nous ont donné, chacun, une colonie d'une Myxobactérie orange. Les colonies sont d'abord petites, rondes, blanches, légèrement bombées, de 1 mm de diamètre (fig. 27 *a*) (4 heures après l'ensemencement, 37° C). A ce stade, les préparations révèlent de gros bâtonnets de 1 μ de large sur 3-4 μ de long, immobiles, Gram-négatifs, serrés dans une masse de mucus. Bientôt, ils se groupent en microcolonies plus ou moins rondes, à contour encore mal défini (fig. 27 *d*). Les cellules s'arrondissent et certaines sont même franchement rondes (fig. 27 *e*). Après 12 heures de cultures à 37° C, le centre de la colonie s'affaisse pour ne laisser qu'une mince pellicule tandis que les bords s'épaississent (fig. 27 *b*). Le pigment jaune apparaît. Ces colonies de 2 mm de diamètre se détachent d'un seul bloc du substrat. Leur forme correspond à la formation de microcolonies ou cystes bien définis (terminologie de Bergey). Les individus immobiles, qui ont pris une forme coccoïdale, sont assemblés en microcolonies d'une vingtaine de cellules serrées les unes contre les autres (10 μ de diamètre). Les individus soudent entre eux la portion de leur paroi extérieure ; ainsi, les cellules ont une paroi commune qui délimite le cyste (fig. 27 *e*) ; celles qui se trouvent à l'intérieur du cyste deviennent de plus en plus réfringentes et coccoïdes (fig. 27 *f*). Tous les cystes (de 15 μ de diamètre environ) sont pris dans une masse mucilagineuse et étroitement serrés les uns aux autres. De ce fait, les cystes situés à la jonction de 3 cystes ovoïdes ont une forme rectangulaire (fig. 27 *f*). Dans les vieilles colonies, en forme de choux-fleurs jaune d'or orange (fig. 27 *c*) de 4 à 5 mm de diamètre et de 2-3 mm de hauteur, on ne distingue plus les individus à l'intérieur d'un cyste ; ceux-ci forment une masse assez vague, très réfringente.

A partir du moment où la colonie se creuse, nous voyons, à tous les stades qui se succèdent, de jeunes cystes en formation mais dont les individus sont vidés de leur contenu ; ce ne sont plus que des parois cellulaires étroitement liées (27 *g*). On remarque aussi des débris de parois isolés. Nous ne savons pas à quoi correspondent ces figures.



Fig. 27a

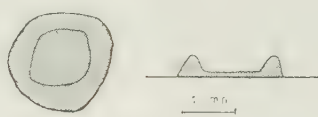


Fig. 27b

FIG. 27 a. — *Angiococcus disciformis* jeune colonie.

FIG. 27 b. — *A. disciformis* colonie.

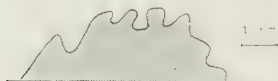


FIG. 27 c. — *A. disciformis* vieille colonie.

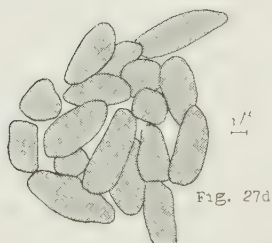


Fig. 27d

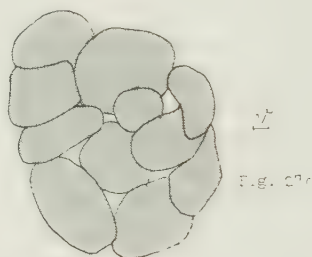


Fig. 27e



Fig. 27f

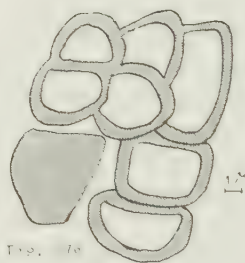


Fig. 27g

Développement de *A. disciformis* (vues en contraste de phase).

FIG. 27 d. — Jeunes cellules groupées.

FIG. 27 e. — Jeune cyste, cellules avec parois soudées.

FIG. 27 f. — Groupe de vieux cystes.

FIG. 27 g. — Jeune cyste avec cellules vidées de leur contenu.

Le germe se cultive bien sur tous les milieux usuels : VF, eau peptonée, bouillon pdt-1, etc. Il est fortement pectinolytique et produit une pectinestérase.

Dans le milieu liquide, il y a formation d'un voile épais et conduqué en surface, sans trouble du milieu. Le voile tombe bientôt au fond du tube. Il s'en reforme alors un autre, moins épais et ainsi de suite jusqu'à 5 fois.

Ce germe n'attaque pas la cellulose.

Sa durée de vie est très brève (15 jours) ; quelques mois (2-3) à la glacière. Nos deux souches ne sont actuellement plus en vie.

A cause de la formation de cystes ovoïdes avec des individus coccoïdes, nos souches appartiennent à la famille des *Myxococcaceæ* (ordre des *Myxococcales*). La présence de cystes nous conduit au genre *Angiococcus*. Deux espèces, bien décrites, sont connues. Nos souches s'identifient parfaitement avec *Angiococcus disciformis*, dont les colonies jaune orange contiennent des cystes de 15 à 20 μ de diamètre (fig. 27 a-27 h). L'autre espèce est cellulolytique et produit un pigment jaune pâle.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

A LA III^e PARTIE

En résumé, cette étude systématique nous montre que la plupart des Bactéries pectinolytiques isolées peuvent se classer dans des espèces et genres déjà décrits et fort répandus mais dont le pouvoir pectinolytique n'avait pas été étudié. Les Bactéries sont des germes banaux qui entre autres possèdent une activité pectinolytique. Il n'y a donc pas lieu de former un genre spécial pour ranger certaines Bactéries pectinolytiques. Ainsi, Dowson (34) dans son traité sur les Bactéries phytopathogènes, propose de séparer les *Erwinia* pectinolytiques, peu nombreuses, des *Erwinia* non pectinolytiques, par un genre nouveau : les *Pectobacterium*. La propriété pectinolytique doit rester un caractère d'espèce et, tout au plus, de sous-genre, pour les groupes d'espèces très homogènes.

QUATRIÈME PARTIE

ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE
EN CULTURE PURE DES MICROORGANISMES
ISOLÉS ET DE COLLECTION

INTRODUCTION

Au sein de chaque espèce de notre collection, nous avons sélectionné un certain nombre de souches sur lesquelles nous avons étudié :

- 1° La nature des enzymes pectinolytiques sécrétées ;
- 2° Le taux de dégradation de la pectine en fonction du temps.

C'est le système de Demain et Phaff (28) qui a été adopté pour la nomenclature des enzymes, avec la restriction que nous avons conservé le mot *polygalacturonidase* adopté par les enzymologistes français au lieu du *polygalacturonase* des Anglais qui sonne mieux mais est moins précis.

Les enzymes qui coupent les ponts glucosidiques de la molécule de pectine sont des *polygalacturonidases* (qui correspond aux termes plus anciens de pectinase, dépolymérase, glycosidase).

Selon leur mode d'action, Demain et Phaff les divisent en quatre grands groupes logiques :

Si l'attaque se fait en bout de chaîne, on ajoutera le préfixe *exo*. Au contraire, si l'attaque a lieu au hasard de la molécule, libérant d'abord des polyuronides, on utilisera le préfixe *endo*.

Les *polygalacturonidases* proprement dites sont les enzymes attaquant de préférence les acides pectiques et les pectines peu méthylées tandis que les *polyméthylgalacturonidases* démolissent avant tout les pectines.

Nous aurons les quatre groupes suivants :

- Endo-polygalacturonidase : endo-PG ;
- Endo-polyméthylgalacturonidase : endo-PMG ;
- Exo-polygalacturonidase : exo-PG ;
- Exo-polyméthylgalacturonidase : exo-PMG.

Ces groupes peuvent, à leur tour être subdivisés, comme nous le verrons dans notre conclusion.

Le deuxième groupe d'enzymes pectinolytiques est celui qui déméthyle la pectine. Ces enzymes portent le nom de : *pectine-méthylestérase*.

L'expérimentation, qui permet d'établir la liste des enzymes de la pectinolyse pour une souche donnée, peut être détaillée comme suit :

a) Action sur pectine très déméthylée à pH 7,5, 5,5, et 4 (viscosimétrie) ;

b) Action sur pectine très méthylée à pH 7,5, 5,5 et 4 (viscosimétrie) ;

c) Chromatographie du produit de dégradation de la pectine pour savoir si l'enzyme est du type endo ou exo (libération de polyuronides ou d'acide galacturonique seulement) ;

d) Présence ou absence de pectineméthylestérase à pH 7,5 et 5,5 (acidification d'une solution de pectine).

Nous avons ajouté le point :

e) Présence d'enzymes après culture sur milieu dépourvu de pectine (VF ou eau peptonée). Ceci nous renseigne sur la nature constitutive ou adaptative des enzymes sécrétées.

Avant de commenter en détail ces expériences, nous pouvons dire que les enzymes de tous les microorganismes examinés sont extracellulaires. En effet, tandis que les corps microbiens eux-mêmes sont sans activité aucune, les enzymes se trouvent toujours en abondance dans le liquide de culture dépourvu de microorganismes.

CHAPITRE PREMIER

LES TECHNIQUES

MILIEUX DE CULTURE POUR LA PRODUCTION D'ENZYMES

Il n'est pas nécessaire d'avoir des milieux gélifiés ; des solutions de pectine liquide conviennent parfaitement.

Aérobies :

Pectine ruban rouge	8 g
Nitrate d'ammonium	3 »
Extrait de levure	3 »
Extrait de terre	50 cm ³
Solution de Winogradsky	50 »
Eau distillée	900 »
Lessive de soude au 1/10	6 »

Préparation et stérilisation comme pour les milieux ordinaires à la pectine.

Répartition : 14 cm³ en tubes de 22.

Après stérilisation, les milieux restent liquides et sont à pH 7.

La production d'enzymes est variable pour les différentes espèces ; en général, elle est à son maximum sitôt la phase logarithmique de croissance achevée (2-7 jours).

Anaérobies :

Pectine ruban rouge	8 g
Extrait de levure (Difco ou Byla)	5 »
Bouillon de pommes de terre	1 000 cm ³
Lessive de soude 1/10	6 »

Préparation et stérilisation comme d'ordinaire.

Répartition en fioles de Jaubert (ou en tubes de 14 mm). Milieu liquide après stérilisation, pH 7.

Avant l'ensemencement, on régénère 1/2 heure les milieux au bain-marie bouillant. L'ensemencement se fait avec un tube de culture fraîche sur bouillon pdt-1 (ou 1 cm³ de cette culture pour un tube de 14).

Tous les germes anaérobies se cultivent aisément sur ce milieu avec un fort dégagement gazeux. Le maximum d'enzymes se trouve juste après la fin de la phase logarithmique de croissance.

Il est nécessaire de cultiver les anaérobies sur un milieu riche. Le remplacement du bouillon de pommes de terre par une eau peptonée ou du bouillon de pommes de terre désamidonné provoque une culture lente, voire même nulle et la pectine est peu ou plus lentement fermentée. Les pectinolytiques anaérobies semblent avoir besoin d'un hydrate de carbone ou d'une autre substance facilement attaquable qui permettent le départ de la culture et l'attaque plus aisée de la pectine. D'autres auteurs ont déjà fait cette constatation. Ainsi Jones (67) note dans un travail déjà ancien, que *E. carotovora* attaque mieux la pectine si l'on ajoute du glucose au milieu. De même Lanigan (84) précise que *Cl. laniganii* ne se cultive pas ou peu sur milieu à base de pectine et d'eau peptonée et qu'il est nécessaire d'ajouter du glucose pour une bonne culture.

SUBSTRATS ENZYMATIQUES

Ils sont de deux types : les uns contenant une pectine très déméthylée (de 3 à 6 %) ; les autres avec de la pectine proprement dite (degré de méthylation de 14 à 16 %). Pour la mise en pratique de tous ces substrats, nous avons eu recours au travail de base de Smith (151).

Substrat de type « R » (pectine ruban rouge (déméthylée)).

Substrat de base :

Pectine ruban rouge	7	g
Chlorure de sodium	11,6	»
Chlorure de calcium	0,14	»
Phénol	2,5	»
Eau distillée	1 000	cm ³

La préparation a lieu comme à l'ordinaire. Le substrat n'est pas stérilisé, le phénol inhibant toute croissance de microorganismes. On prépare 1 litre de substrat que l'on conserve dans une armoire. Il se forme

un gel mou. On peut aller jusqu'à 1 % de pectine. Ce substrat de base sert à la préparation de trois substrats de pH différents : pour les obtenir, il faut d'abord bien agiter le substrat de base dont on chauffe 100 cm³ au bain-marie à 70° C.

Substrat « R » à pH 7,5.

A 100 cm³ de substrat de base, ajouter 1,6 cm³ d'une solution à 10 % de phosphate disodique.

Mélanger, vérifier le pH au pH-mètre et répartir à raison de 7 cm³ par tubes de 14 mm.

Substrat « R » à pH 5,5.

A 100 cm³ de substrat de base, ajouter 0,5 cm³ d'une solution à 10 % de phosphate disodique.

Mélanger, vérifier le pH au pH-mètre. Répartition *idem*.

Substrat « R » à pH 4.

Ne rien ajouter. Répartition *idem*.

Substrat de type « B » (pectine ruban brun (maximum de méthylation)).

Substrat de base :

Pectine ruban brun	7	g
Chlorure de sodium	11,6	»
Chlorure de calcium	0,14	»
Phénol	2,5	»
Eau distillée	1 000	cm ³

Ce substrat reste liquide. On prépare à nouveau 3 substrats de pH différents à partir de celui-ci.

Il est inutile de chauffer la solution.

Substrat « B » à pH 7,5.

A 100 cm³ de substrat de base, ajouter 3,6 cm³ d'une solution à 10 % de phosphate disodique.

Mélanger, vérifier le pH au pH-mètre et répartir (7 cm³ en tubes de 14).

Substrat « B » à pH 5,5.

A 100 cm³ de substrat de base, ajouter 1,5 cm³ d'une solution à 10 % de phosphate disodique.

Mélanger, vérifier le pH et répartir.

Substrat « B » à pH 4.

A 100 cm³ de substrat de base, ajouter 0,5 cm³ d'une solution à 10 % de phosphate disodique.

Mélanger, vérifier le pH, répartir.

Les 6 substrats préparés ainsi doivent être d'abord entreposés 24 heures à la glacière. Ils ne peuvent être conservés plus d'une semaine après leur préparation, sinon le pH baisse lentement.

Lorsqu'on a obtenu une bonne culture du germe que l'on veut étudier, le liquide de culture est centrifugé pour éliminer les corps microbiens. Le liquide clair obtenu, qui contient les enzymes, est ajusté aux différents pH des substrats, soit par HCl dilué pour les aérobies alcalinisant le milieu, soit par de la soude diluée pour les anaérobies qui acidifient le milieu de culture. Chaque tube de substrat reçoit alors 1 cm³ du liquide préparé. Le substrat enzymatique (7 cm³) et la solution d'enzymes (1 cm³) sont vigoureusement mélangés puis portés à l'étude à 30° C, pendant 24 heures.

Toutes traces d'enzyme du type polygalacturonidase, contenue dans le liquide de culture abaissera la viscosité des substrats enzymatiques.

Après 24 heures de contact substrat-enzyme, on procède à la mesure de la viscosité du mélange à l'aide de viscosimètres. Les viscosimètres employés sont basés sur le principe d'Ostwald (type Afnor Prolabo) (fig. 28). Le temps d'écoulement du liquide est mesuré en secondes, à une température constante de 20° C, entre deux points fixes du viscosimètre.

Fig. 28. -
Viscosi-
mètre du
type Ost-
wald.

Nous nous sommes servis principalement de deux viscosimètres : l'un « R » pour les substrats « R » très visqueux, avec un diamètre du capillaire de 1,50 mm (longueur 13 cm, volume 3,7 cm³) ; l'autre « B », pour les substrats « B » moins visqueux, avec un diamètre du capillaire de 1,05 mm (longueur et volume identiques à R).

Les résultats peuvent être exprimés en poises, qui est l'unité de viscosité du système CGS.

Formule de la poise :

$$\eta = \frac{\pi}{128} \times \frac{p_0 \cdot D^4}{q \cdot l} \text{ poises,}$$

où :

p_0 = pression atmosphérique en millibars,

D = diamètre du capillaire en centimètres,

l = longueur du capillaire en centimètres,

q = le volume conventionnel en centimètres cubes écoulé dans l'unité de temps (secondes).

Pour connaître, par exemple, la viscosité de l'eau sur le viscosimètre R, à la température de 20° C et à 1 015 millibars de pression, on mesurera le temps d'écoulement de l'eau sur ce viscosimètre : il est de 4 secondes. Ceci nous donnera :

$$\eta = \frac{3,14}{128} \times \frac{1\,015 \cdot (0,15)^4}{3,7 \cdot 13} \times 4 = 0,00104,$$

la viscosité de l'eau est de 1/1 000 de poise environ. Les différences de pression atmosphérique observées à Paris n'interviennent que fort peu dans les résultats finaux.

On comparera la viscosité des substrats attaqués par les enzymes à la viscosité de substrats témoins non attaqués et à la viscosité de l'eau, qui est la limite inférieure.

CHROMATOGRAPHIE DES PRODUITS TERMINAUX DE DÉGRADATION DE LA PECTINE

Lorsque la viscosité des substrats est fortement diminuée par l'enzyme et se rapproche de celle de l'eau, il faut montrer si les produits de dégradation sont essentiellement des polyuronides (acides penta-, tétra-, tri-, di-galacturoniques) ou seulement de l'acide monogalacturonique. On sait ainsi s'il s'agit d'une endo-polygalacturonidase ou d'une exo-polygalacturonidase. Nous avons repris le procédé de Smith (152) : aux 8 cm³ du mélange substrat-enzyme, on ajoute 8 cm³ d'alcool absolu ; la pectine non encore digérée précipite, alors que les polyuronides sont fortement solubles dans ce mélange. On centrifuge afin de séparer le précipité du liquide ; on conserve ce dernier auquel on additionne 1 goutte de CaCl₂ en solution aqueuse à 1 % et 15 ml d'alcool absolu. Il se forme un précipité léger, blanc, qui contient les sels de calcium des uronides ; ce précipité est recueilli par centrifugation, séché, puis suspendu dans 1 cm³ d'eau distillée. A cette suspension, on ajoute une

pincée de permutite ou d'amberlite IR 120, traités par HCl ; pour libérer les uronides du calcium. On place 0,1 cm³ (5 × 20 mm³) du liquide sur le chromatogramme (papier Whatman n° 1). Les taches témoins sont effectuées par 5 mm³ d'une solution à 0,5 % d'acide galacturonique.

Le solvant est le suivant :

Acétate d'éthyle	300 cm ³
Acide acétique	300 »
Eau distillée	300 »

Le chromatogramme est placé dans une cuve à chromatographie, à phase descendante. Au bout de 24 heures environ, on retire la feuille qu'on laisse sécher au laboratoire et on la pulvérise avec le mélange suivant :

Acide trichloracétique	1,65 g
Benzidine	1,82 »

le tout dissous dans 100 cm³ d'éthanol à 96°.

La feuille est ensuite placée pendant 15 minutes à l'étuve à 100° C. Les taches d'acide galacturonique apparaissent en brun foncé ; les taches de polyuronides, qui se trouvent derrière cet acide, sont également brunes. Il est évident que le polyuronide migre d'autant plus lentement sur le chromatogramme qu'il est polymérisé.

Ainsi la pectine elle-même et les composés comportant plus de 8 mail-
lons d'acide galacturonique ne donnent aucune tache car ils ne se déplacent pas.

PECTINE-MÉTHYLESTÉRASE

L'acidification d'une solution de pectine (virage d'un indicateur) par un liquide de culture révèle la présence d'une pectine-méthylestérase ou *PME*.

Substrat (d'après Smith (151)) :

Pectine ruban brun	7 g	} Préparation habituelle
NaCl	6 »	
Phénol	2,5 »	
Eau distillée	1 000 cm ³	
Solution d'indicateur universel prolabo	10 »	

ou : solution à 1 % du bleu de bromothymol 2,5 cm³.

L'indicateur universel donne des résultats plus exacts et permet, en outre, d'employer le substrat de base pour les Bactéries et pour les Champignons. Au moment de l'emploi, ce substrat de base est réparti en tubes de 14, à raison de 7 cm³. On ajoute 1 cm³ du liquide de culture, clarifié par centrifugation et, pour ajuster le pH, de la soude diluée au 1/10. Pour les Bactéries, le pH est ajusté à 7, pour les Champignons à 5,5, et on incube pendant 24 heures à 30° C.

Nous indiquerons par +, ++ ou +++ l'intensité de la réaction (virage du vert au jaune +, du vert à l'orange ++, du vert au rouge +++).

NATURE CONSTITUTIVE OU ADAPTATIVE DES ENZYMES

Nous avons cultivé toutes nos souches de pectinolytiques sur des milieux sans pectine et reporté ensuite 1 cm³ du liquide de culture sur chaque tube des substrats enzymatiques déjà décrits.

Tous les aérobies se cultivent aisément sur eau peptonée et parfois sur VF glucosé. Nous avons employé tantôt l'un, tantôt l'autre ou un mélange des deux, suivant le germe. Trois repiquages successifs sur ces milieux doivent être pratiqués avec une öse à partir des milieux végétaux, afin d'obtenir un milieu tout à fait exempt de pectine.

Les anaérobies peuvent se cultiver sur VF glucosé après passage sur le milieu intermédiaire ep-l-g. Une dizaine de repiquages sont nécessaires pour éliminer toute trace de pectine.

CINÉTIQUE DE LA PECTINOLYSE

Pour chaque espèce nous avons mesuré le taux de dégradation de la pectine en fonction du temps. Pour cela, nous avons, par une méthode simple, évalué le taux de pectine résiduelle, pendant 7-10 jours consécutifs, après l'ensemencement du germe sur les milieux décrits au début de cette partie. Nous exprimons en pourcentage le taux de pectine digérée par rapport au milieu témoin.

La quantité de pectine résiduelle est mesurée par précipitation de la pectine à l'alcool. A 2 cm³ de liquide de culture débarrassé des corps microbiens par centrifugation, on additionne 2 cm³ d'éthanol absolu. Le précipité est recueilli par centrifugation, séché à 50° C pendant 24 heures et pesé.

Exemple : nous ensemençons *Plectridium pectinovorum* 06/11. 2 cm³ du milieu témoin pèsent au départ 26 mg :

- après 24 heures, nous avons 20,4 mg de pectine résiduelle ;
- après 48 heures, nous avons 11,5 mg de pectine résiduelle ;
- après 96 heures, nous obtenons 8,5 mg ;
- après 148 heures, nous obtenons 6 mg.

Pour connaître le nombre de milligrammes de pectine digérée, il faut soustraire ces chiffres de ceux donnés par le milieu témoin :

— soit après 24 heures 26 mg — 20,4 mg = 4,6 mg	(18,4 %)	} de pectine digérée
— soit après 48 heures 26 mg — 11,5 mg = 13,5 mg	(54 %)	
— soit après 96 heures 26 mg — 8,5 mg = 16,5 mg	(66 %)	
— soit après 148 heures 26 mg — 6 mg = 19 mg	(76 %)	

Ces résultats peuvent être intégrés dans une courbe indiquant le pourcentage de pectine disparue en fonction de l'âge de la culture.

CHAPITRE II

ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE DES EUBACTÉRIES ASPORULÉES

VISCOSITÉ DES SUBSTRATS TÉMOINS A 1 015 MILLIBARS DE PRESSION

Temps d'écoulement en secondes		=	Viscosité en poises
Substrats R	275	=	0,0715
Substrats B	124	=	0,00880

VISCOSITÉ DE L'EAU A 20° (ET A 1 015 MILLIBARS)

Temps d'écoulement sur viscosimètre R : 4 secondes
 Temps d'écoulement sur viscosimètre B : 14,5 secondes = 0,00103 poise.

Genre *Pseudomonas*.

Ps. sauro mali, souche x/46/3.

Après culture sur pectine :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8,0	0,00208
5,5	24,0	0,00624
4	270,0	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
27,0	0,00192
68,0	0,00483
120,0	0,00852

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité des substrats : adaptivité des enzymes.

Chromatographie des substrats attaqués :

R et B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques = endo-polygalacturonidases.

PME : négatif.

Le germe sécrète deux enzymes : une endo-PG et une endo-PMG qui sont adaptives. Leur action optimum se fait à pH 7,5. Aucune action à pH 4.

Cinétique de la pectinolyse (fig. 29).

Le pourcentage de pectine baisse régulièrement et doucement, la digestion atteint 36 % au bout de 7 jours et 54 % après 3 semaines. La courbe indique que la pectinolyse est plus forte la première semaine que les semaines suivantes où l'attaque diminue de plus en plus.

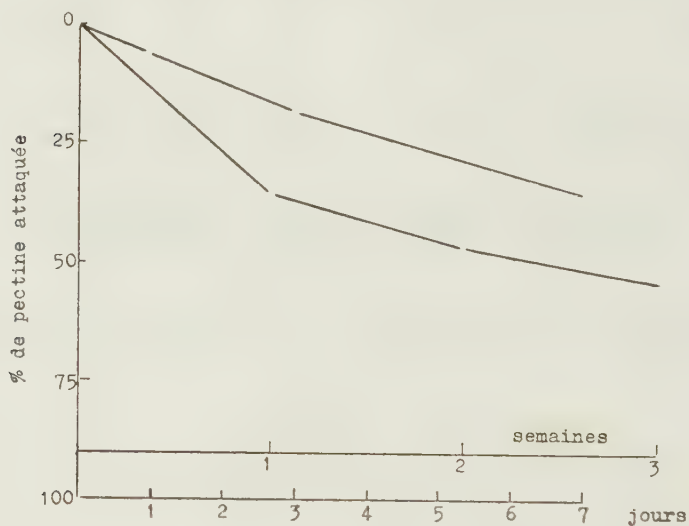


FIG. 29. — *Ps. sauromali*.

Ps. schuykilliensis.

Nous reportons ici la moyenne de 9 souches :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	4,5	0,00117
5,5	8,5	0,00221
4	270,0	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
20	0,00142
27	0,00483
109	0,00774

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	6,0	0,00156
5,5	9,0	0,00234
4	270,0	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
55	0,00391
70	0,00497
120	0,00852

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

PME : négatif.

Ces souches sécrètent deux enzymes : une endo-PG et une endo-PMC. Seule l'endo-PG est constitutive, l'autre adaptative ; la baisse de viscosité observée sur le substrat B n'est que le résidu d'action de l'endo-PG sur pectine très méthylée.

Le pH d'action est de 7,5 pour les deux enzymes.

Cinétique (fig. 30).

Baisse régulière, plus forte pendant les premiers jours ; au bout d'une semaine, 66 % sont digérés, 72 % après 3 semaines.

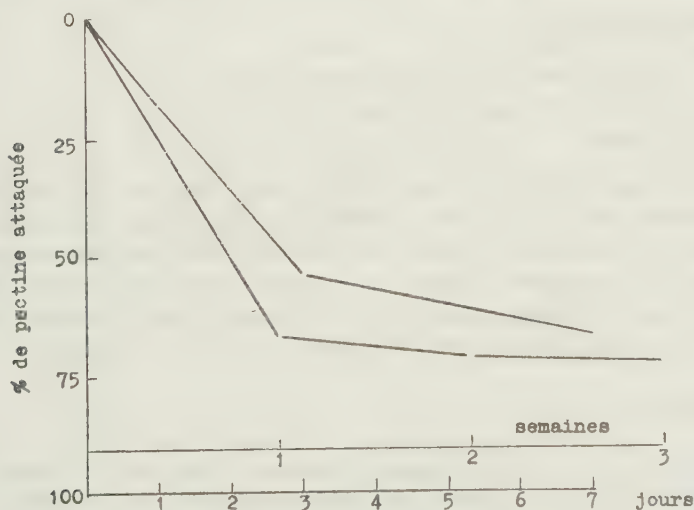


FIG. 30. — *Ps. schuylikillensis*.

Ps. fairmountensis.

Souche RsSN :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00130
5	7,5	0,00195
4	270	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
48	0,00341
59	0,00419
113	0,00802

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	15	0,00390
5	25	0,00650
4	270	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
70	0,00497
85	0,00604
120	0,00852

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

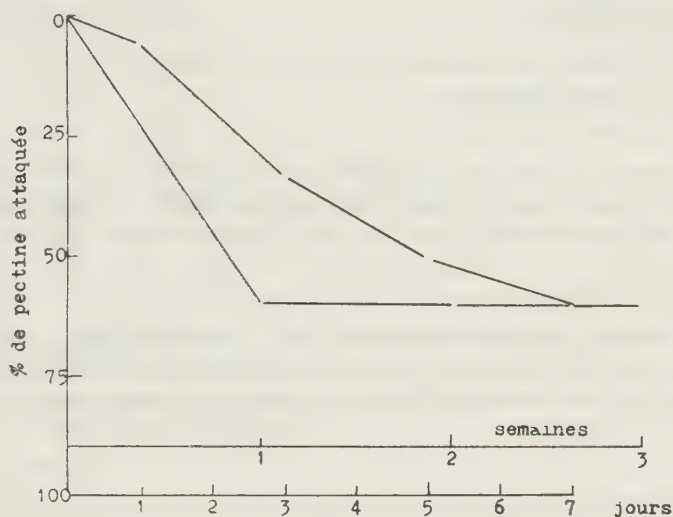
B : même résultat mais beaucoup plus faible.

PME : négatif.

Les résultats indiquent d'abord la présence d'une endo-PG qui semble constitutive. Nous ne saurions affirmer que le germe produit aussi une endo-PMG ; toutefois, il semble que la baisse de viscosité du substrat B ne soit pas uniquement due à un résidu d'action de l'endo-PG mais bien à une endo-PMG propre en petite quantité dans le milieu. Cette enzyme est adaptative. Toutes deux sont actives à pH optimum de 7,5.

Cinétique (fig. 31).

La courbe baisse graduellement et lentement bien que l'attaque soit, comme d'ordinaire, plus forte pendant les premiers jours. La pectinolyse s'arrête au bout d'une semaine ; 60 % de la pectine sont digérés.


 FIG. 31. — *Ps. fairmountensis*.

Ps. boreopolis.

Moyennes des souches 09/3 et 17/48 qui agissent de façon identique.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5,5	0,00143
5,5	13,0	0,00338
4	210,0	0,0546

Substrat B

Secondes	Poises
41	0,00291
80	0,00568
123	0,00873

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5,5	0,00143
5,5	6,5	0,00163
4	205,0	0,0533

Substrat B

Secondes	Poises
19	0,00135
21	0,00149
120	0,00852

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : *idem* mais plus faible.

PME : négatif.

Ce germe produit deux enzymes : une endo-PG constitutive et une endo-PMG qui n'apparaît que faiblement sur milieu à base de pectine, mais fortement sur VF ; elle est donc constitutive aussi. Pas de PME.

Cinétique (fig. 32).

La courbe s'abaisse régulièrement les 7 premiers jours ; 62 % de pectine ont alors disparu. Pendant les deux semaines qui suivent la pectinolyse, elle devient de plus en plus faible pour n'atteindre que 67 % en 3 semaines.

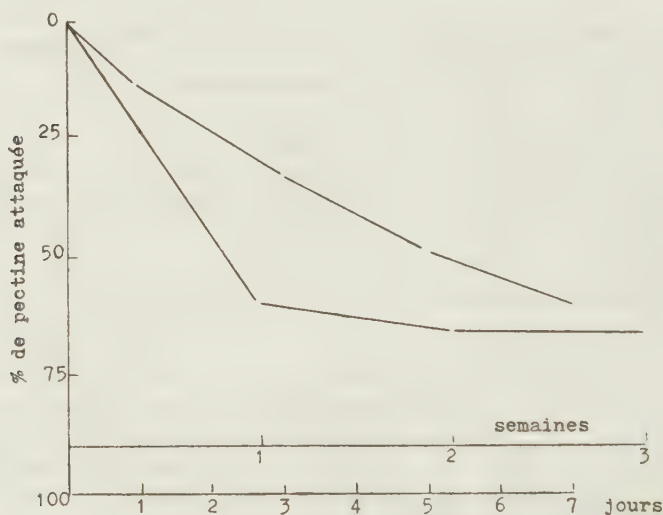


FIG. 32. — *Ps. boreopolis*.

Ps. putida souche S20 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	6	0,00156
5,5	7	0,00182
4	270	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
64	0,00454
83	0,00589
121	0,00859

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	9	0,00234
5,5	20	0,00520
4	270	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
72	0,00511
86	0,00611
121	0,00859

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : tracicules des mêmes produits.

PME : négatif.

Le germe ne produit qu'une endo-PG constitutive qui agit faiblement sur pectine B, on le voit par une légère baisse de viscosité des substrats B.

L'action optima de l'enzyme se trouve comme pour les autres germes, à pH 7,5.

Cinétique (fig. 33).

La chute de la courbe est assez brusque les 3 premiers jours de culture. Ce délai passé, la dynamique reprend son aspect normal pour les

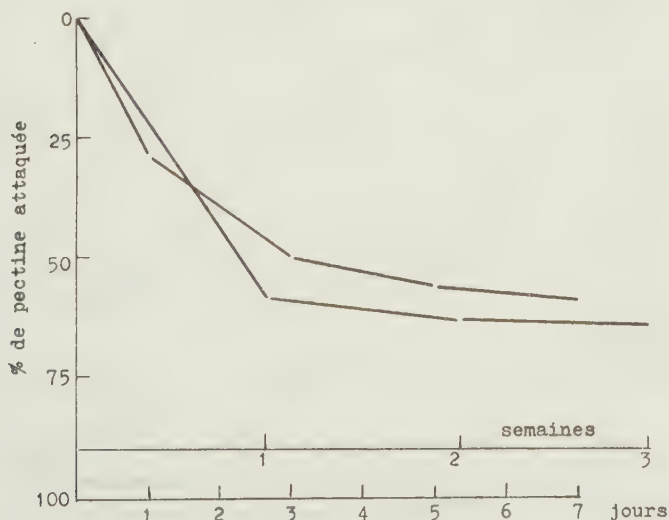


FIG. 33. — *Ps. putida*.

Pseudomonas et descend de plus en plus lentement. 50 % de la pectine sont digérés au bout de 3 jours, 58 % après 7 jours et 64 % après 3 semaines.

Genre **Empedobacter**.

E. pectinovorum.

11 souches ont été étudiées. Elles agissent toutes de façon identique. Nous reportons ici la moyenne des chiffres des 11 souches.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00130
5,5	7	0,00182
4	270	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
72	0,00511
86	0,00611
120	0,00852

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité observée.

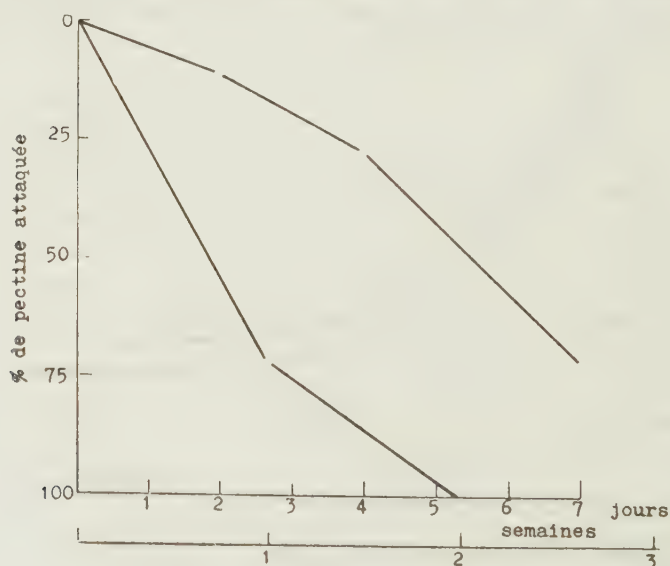


FIG. 34. — *E. pectinovorum*.

Chromatographie :

R : acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : tracicules des mêmes produits.

PME : toujours négatif.

On ne peut déceler qu'une seule enzyme pour ce germe. Il s'agit d'une endo-PG avec un pH optimum d'action de 7,5, adaptative.

Cinétique (fig. 34).

La pectinolyse d'abord lente devient violente à partir du 4^e jour. La pectine est digérée à 100 % en 2 semaines. La brusque descente de la courbe correspond à une fermentation gazeuse des nitrates du milieu.

Empedobacter aquatilis.

Les chiffres suivants donnent la moyenne de 8 souches qui agissent de façon semblable.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	6	0,00156
5,5	8	0,00208
4	270	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
75	0,00533
90	0,00639
122	0,00866

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité observée.

Chromatographie :

R : les acides penta-, tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

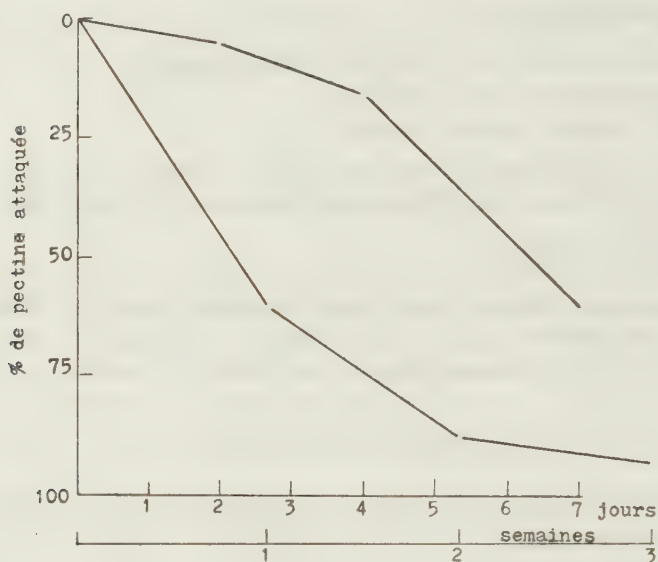
B : les mêmes acides à l'état de traces.

PME : négatif.

Résultats identiques à ceux de *E. pectinovorum* ; production d'une endo-PG adaptative, à pH optimum d'action de 7,5. Pas de PME.

Cinétique (fig. 35).

Même phénomène que pour le germe précédent. Les souches qui ne fermentent pas les nitrates avec gaz, présentent une courbe dont les pentes sont plus douces.

FIG. 35. — *E. aquatilis*.*E. dormitator*.

Moyenne de trois souches :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	7	0,00182
5,5	35	0,00910
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
72	0,00511
90	0,00639
123	0,00873

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité mesurée.

Chromatographie :

R : les acides penta-, tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : pas de taches visibles.

PME : négatif.

Production d'une endo-PG adaptative, avec pH optimum de 7,5.

Cinétique (fig. 36).

Ici encore, la dynamique de la pectinolyse ressemble beaucoup à celle de *pectinovorum* : attaque majeure de la pectine du 4^e au 7^e jour ; digestion presque totale, au bout de 3 semaines.

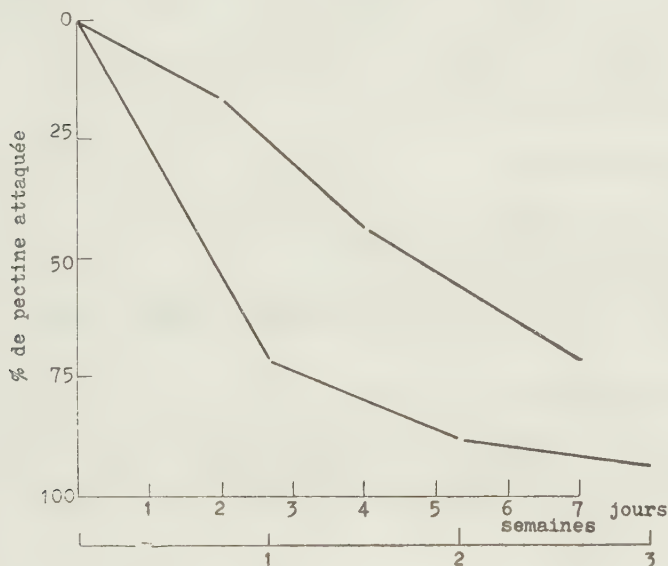


FIG. 36. — *E. dormitator*.

E. balustinum (une souche).

Ce germe est très peu pectinolytique ; aussi n'avons-nous pu recueillir suffisamment d'enzymes pour abaisser la viscosité des substrats R et B.

Après culture sur VF, on ne constate pas non plus de baisse de viscosité.

PME : négatif.

Cinétique.

Bien que le gel de pectine soit un peu liquéfié, on ne constate pas de disparition réelle de pectine.

E. exile n. sp., souche 16/49 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5,0	0,00130
5,5	6,0	0,00156
4	203,0	0,0528

Substrat B

Secondes	Poises
70	0,00497
93	0,00660
124	0,00880

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides penta-, tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : tracicules des mêmes produits.

PME : négatif.

Comme toujours, production d'une seule enzyme adaptative ; une endo-PG, surtout active à pH 7,5.

Cinétique (fig. 37).

L'activité pectinolytique se manifeste davantage les premiers jours de culture ; elle ralentit ensuite graduellement.

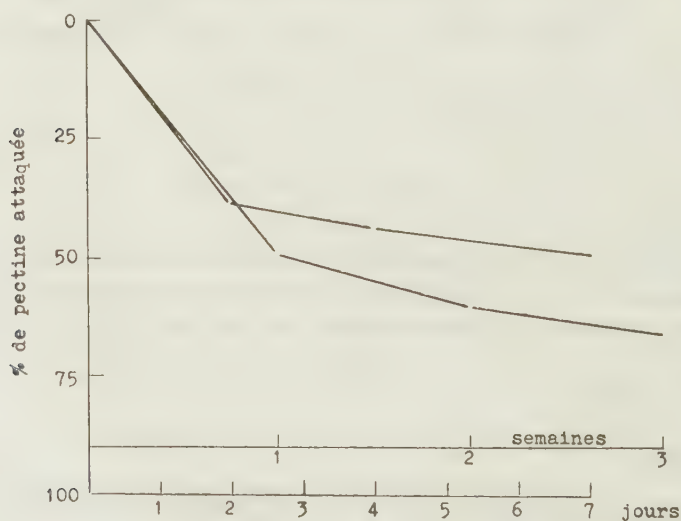


FIG. 37. — *E. exile*.

E. viride n. sp.

Moyenne des souches H5 et RsK5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	14	0,00364
5,5	38	0,00988
4	275	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
84	0,00596
107	0,00760
124	0,00880

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité des substrats.

Chromatographie :

R : les acides tétra- et trigalacturoniques en petite quantité.

B : tracicules des mêmes produits.

PME : négatif.

Ce germe est peu pectinolytique ; cependant, il y a production d'une endo-PG adaptative et active à pH 7,5. Pas de PME.

Cinétique : activité régulière, très moyenne (fig. 38).

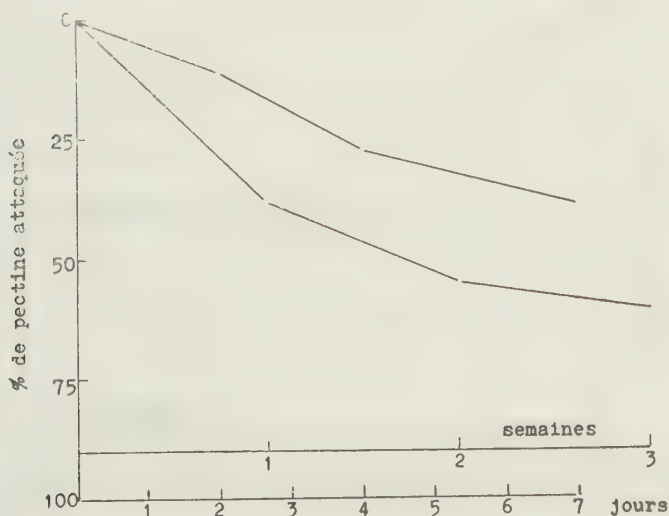


FIG. 38. — *E. viride*.

E. radicum n. sp.

Moyenne de 4 souches :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5,0	0,00130
5,5	6,0	0,00156
4	270	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
79	0,00561
85	0,00604
118	0,00838

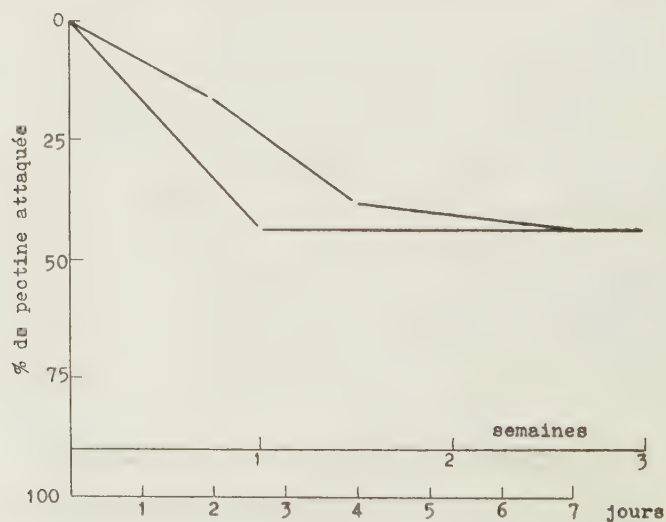
Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00260
5,5	28	0,00728
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
73	0,00518
87	0,00618
122	0,00866

FIG. 39. — *E. radicum*.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : tracicules des mêmes acides.

PME : négatif.

L'endo-PG est de nouveau la seule enzyme présente dans le liquide de culture mais elle semble, cette fois, constitutive. L'activité maximum est toujours à pH 7,5. Pas de PME.

Cinétique (fig. 39).

Après 7 jours, 44 % de la pectine sont digérés et la pectinolyse s'arrête brusquement.

E. radicum var. *ruwenzori* n. sp. nv. var.

Une souche : 42/5.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00130
5,5	6	0,00156
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
73	0,00518
96	0,00682
124	0,00880

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

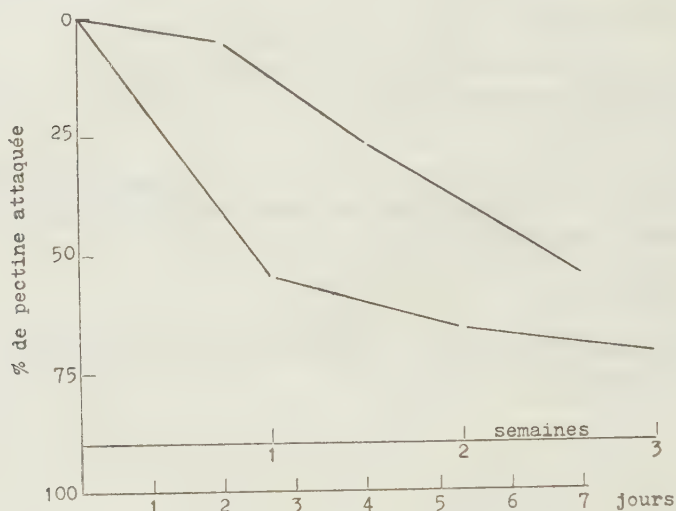
B : tracicules des mêmes acides sauf monogalacturonique.

PME : négatif.

Cette variété donne des résultats un peu différents de l'espèce-type, en ce sens que l'endo-PG est adaptative.

Cinétique (fig. 40).

La dynamique ressemble davantage à celle d'*E. pectinocorum* qu'à l'espèce-type. Nous constatons là aussi que cette souche forme une sorte de transition entre le 1^{er} et le 2^e groupe d'*Empedobacter*.

FIG. 40. — *E. radicum* var. *ruwenzori*.*E. arundineti* n. sp.

Une souche : Ph.

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises		Secondes	Poises
7,5	5	0,00133		60	0,00426
5,5	6	0,00156		68	0,00483
4	183	0,0476		100	0,00710

Après culture sur VF :

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises		Secondes	Poises
7,5	7	0,00182		70	0,00497
5,5	13	0,00338		85	0,00604
4	274	0,0712		124	0,00880

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : tracicules des mêmes produits sauf l'acide monogalacturonique.

PME : négatif.

Ce germe nous donne les mêmes résultats que *E. radicum* : une endo-PG, active à pH 7,5 et constitutive. Pas de PME.

Cinétique : Bactérie extrêmement active pendant les 2 premiers jours de culture puisque 44 % de la pectine sont déjà digérés. La courbe s'abaisse, ensuite, lentement pour atteindre 77 % après 3 semaines de culture (fig. 41).

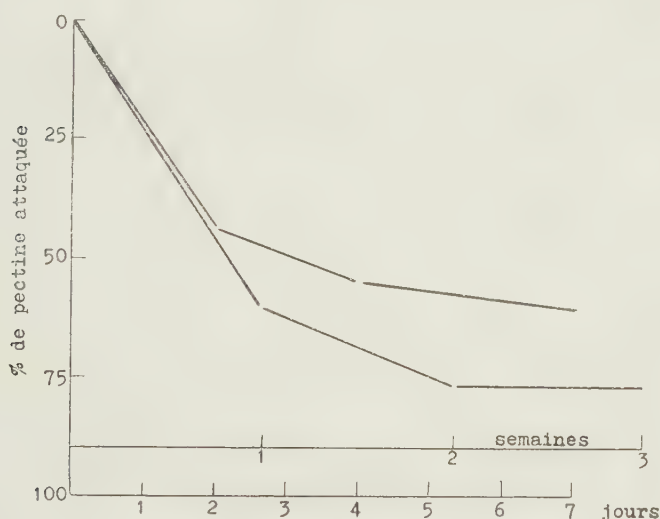


FIG. 41. — *E. arundineti*.

E. esteroaromaticum var. *viscosa* nv. var.

Une souche : PpT.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	6	0,00160
5,5	7,5	0,00198
4	275	0,0718

Substrat B

Secondes	Poises
82	0,00590
91	0,00655
119	0,00857

Après culture sur VF :
Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : les mêmes acides, en plus faible quantité.

PME : négatif.

Le liquide de culture de cette Bactérie contient donc une endo-PG, adaptative, surtout active à pH 7,5.

Cinétique (fig. 42).

La forte production de mucus ne gêne pas le dosage de la pectine résiduelle car celui-ci n'est pas précipité par l'alcool. Cette Bactérie est

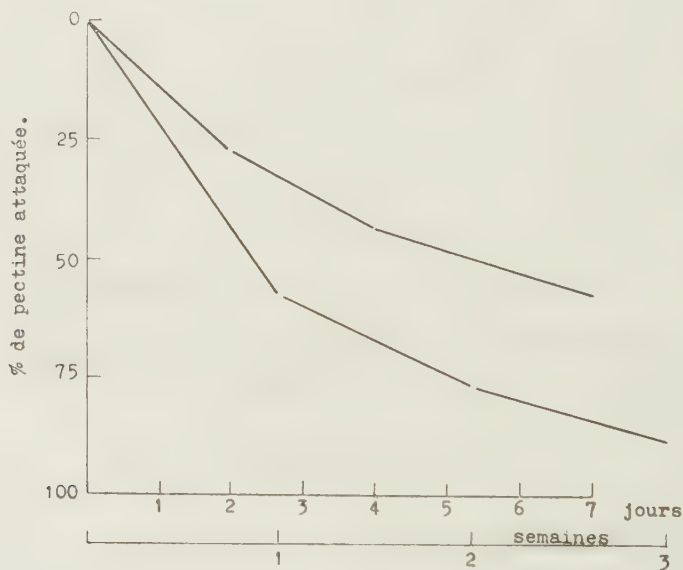


FIG. 42. — *E. esteroaromaticum*.

assez active vis-à-vis de la pectine. Nous obtenons une courbe régulière : 57 % de pectine digérés en 7 jours, 77 % en 14 jours et 88 % en 3 semaines.

Genre *Xanthomonas*.

X. vascularum var. *palustris* nv. var.

 Une souche : TrE₂.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00131
5,5	6	0,00157
4	210	0,00547

Substrat B

Secondes	Poises
40	0,00285
66	0,00469
105	0,00746

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	24	0,00625
5,5	34	0,00885
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
75	0,00533
85	0,00604
124	0,00881

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

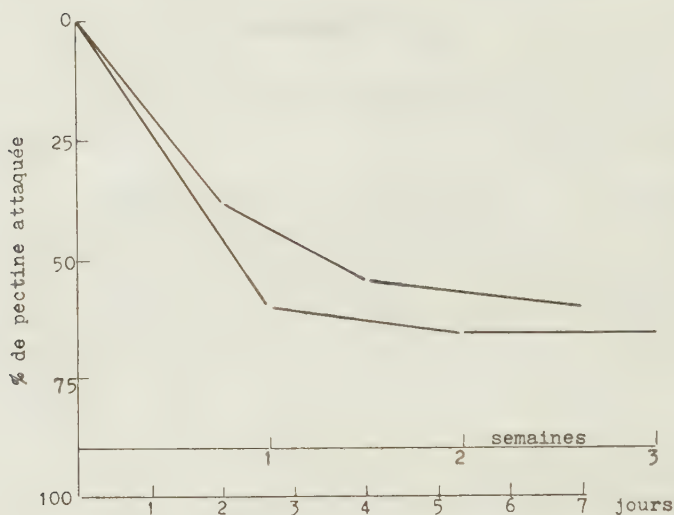
B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques en petite quantité.

PME : négatif.

Ce germe donne, semble-t-il, deux enzymes : une endo-PG et une endo-PMG, vu le chiffre assez bas obtenu sur substrat B. Mais l'action est plus marquée sur acide pectinique que sur pectine. Seule l'endo-PG semble constitutive bien que la production d'enzyme soit plus faible sur VF que sur milieu à la pectine. L'activité optimum est à pH 7,5. Pas de PME.

Cinétique (fig. 43).

La pectinolyse est forte, surtout en début de culture. En 2 jours, 38 % de la pectine sont déjà digérés, 60 % après une semaine ; ce laps de temps écoulé, la pente de la courbe devient pratiquement nulle.

FIG. 43. — *X. vasculorum* var. *palustris*.Genre *Erwinia*.*E. betivora*.

Une souche DE3.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	7	0,00181
5,5	18	0,00467
4	385	0,1121

Substrat B

Secondes	Poises
16,5	0,00116
22,0	0,00155
88,0	0,00623

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	16	0,00415
5,5	38	0,00987
4	275	0,0714

Substrat B

Secondes	Poises
24	0,00169
31	0,00219
98	0,00695

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques en quantité presque égale.

PME : + + + sur pectine, négatif après culture sur VF.

Germe très pectinolytique. Il produit trois enzymes : une endo-PG, une endo-PMG et une PME. Les deux premières sont constitutives avec pH optimum à 7,5.

La viscosité du substrat R augmente à pH 4 ; cela provient du fait que la PME, encore active à ce pH, coagule la pectine ; il n'y a pas de baisse de viscosité, l'endo-PG n'étant plus efficace à ce pH acide. La baisse de viscosité des substrats B pourrait provenir d'une action conjuguée de l'endo-PG et de la PME, faisant croire à la présence d'une endo-PMG ; il n'en est rien car, après culture sur VF, il n'y a plus de PME (qui est adaptative) et la viscosité des substrats B baisse cependant fortement.

Cinétique (fig. 44).

Identique à celle du *Xanthomonas*.

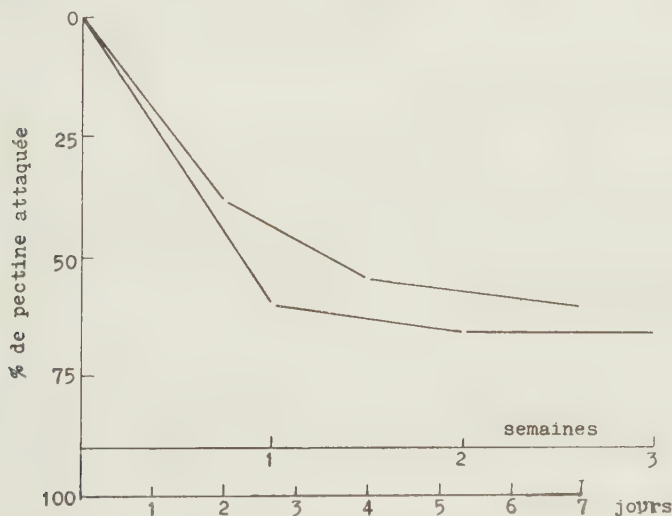


FIG. 44. — *Erwinia betivora*.

Genre *Achromobacter*.*Achr. sewerini*, souche 72/6.

Bien qu'il liquéfie lentement un gel de pectine, ce germe est très peu pectinolytique. Le liquide de culture n'a aucune action sur les substrats R et B. Pas de PME. Les enzymes éventuelles sont adaptatives.

Cinétique.

Nous n'avons pas constaté de perte effective de pectine.

Achr. mariense, souche RsAP.

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises
7,5	5,5	0,00144
5,5	6,0	0,00157
4	270,0	0,0703

Secondes	Poises
40	0,00285
62	0,00441
122	0,00867

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité des substrats.

Chromatographie :

R : les acides penta-, tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

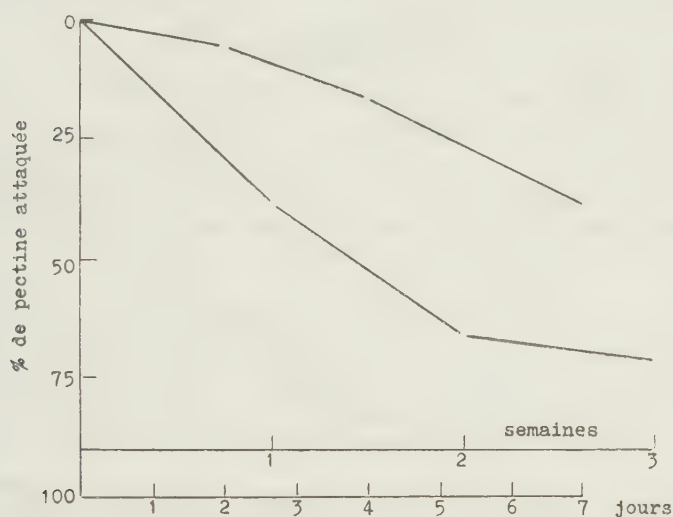
B : les acides penta-, tétra-, tri- et digalacturoniques (3 fois moins que sur substrat R).

PME : négatif.

Le germe produit deux enzymes : une endo-PG et, en très petite quantité, une endo-PMG ; toutes deux sont adaptatives et actives, surtout à pH 7,5.

Cinétique (fig. 45).

Régulière et soutenue pendant les 3 semaines de mesures : 38 % de la pectine sont digérés en une semaine, 66 % après 2 semaines, 71 % en 21 jours.


 FIG. 45. — *Achr. mariense*.

Achr. venenosum, souche 118 A.

La souche est morte avant que la chromatographie et la cinétique de la pectinolyse aient pu être effectuées.

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises	Secondes	Poises
7,5	5,5	0,00144	52	0,00370
5,5	7,5	0,00196	72	0,00512
4	270	0,0703	119	0,00846

Après culture sur VF :

Aucune perte de viscosité enregistrée.

PME : négatif.

Le germe agit, avant tout, sur pectine déméthylée, à l'aide sans doute d'une endo-PG qui est adaptative et active principalement à pH 7,5. Les résultats obtenus sur substrats B sont tangents en effet, ce chiffre intermédiaire ne suffit pas pour affirmer la présence d'une endo-PMG.

Genre *Acinetobacter*.*Acin. metalcaligenes*, souche 24/8.

La mort prématurée de cette souche ne nous a pas permis de faire la chromatographie des produits de catabolisme de la pectine, ni la cinétique de la pectinolyse.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00209
5,5	11	0,00287
4	815	0,2120

Substrat B

Secondes	Poises
28	0,00199
56	0,00398
120	0,00853

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00209
5,5	11	0,00287
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
78	0,00555
89	0,00633
124	0,00881

PME : ++, négatif après culture sur VF.

Ce germe est actif sur acides pectiniques et sur pectines (sur le premier substrat sans doute à l'aide d'une endo-PG constitutive). L'attaque des pectines provient d'une action conjuguée de l'endo-PG avec la PME, mais peut-être aussi, de la présence d'une endo-PMG. Cette hypothèse semble peu vraisemblable étant donné que la baisse de viscosité à pH 5,5 du substrat B serait à ce moment-là plus forte (la PME et l'endo-PMG supposée sont adaptatives).

Acinetobacter butyri.

Nous avons étudié deux souches qui agissent de façon dissemblable.

Souche 12/14 (Ruwenzori) :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00130
5,5	6	0,00156
4	269	0,0699

Substrat B

Secondes	Poises
62	0,00440
102	0,00724
124	0,00880

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité des substrats.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : les mêmes acides mais en très faible quantité.

PME : négatif.

Cette souche ne présente qu'une seule enzyme : une endo-PG adaptative avec maximum d'action à pH 7,5.

Cinétique (fig. 46).

A partir du 2^e jour de culture, la courbe s'abaisse régulièrement. La quantité de pectine digérée reste cependant très moyenne (60 % au maximum).

Souche G. a., sol acide humide (D5) :

Substrat R

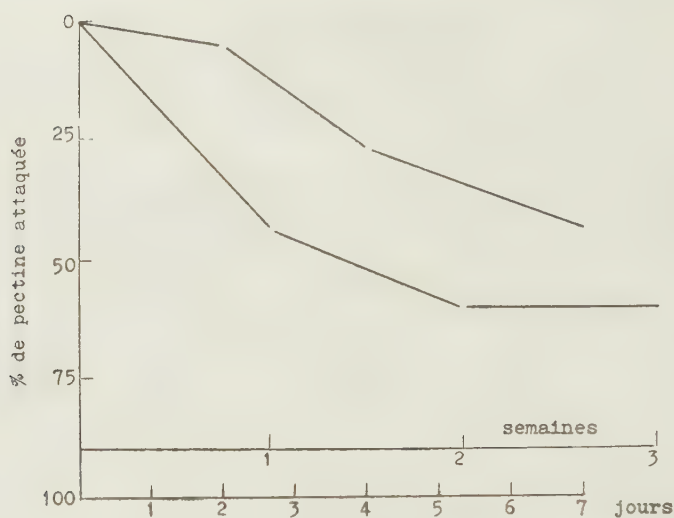
pH	Secondes	Poises
7,5	20,0	0,00519
5,5	275	0,0714
4	275	0,0714

Substrat B

Secondes	Poises
27	0,00191
66	0,00468
120	0,00851

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

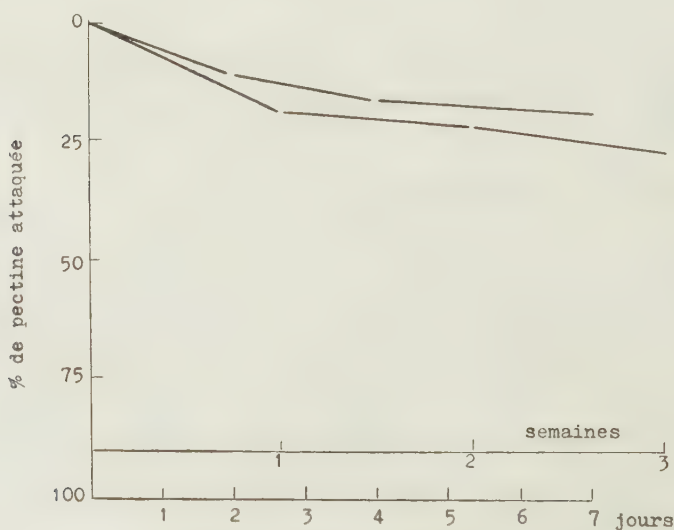
FIG. 46. — *Acin. butyri* 12/14.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les mêmes acides en quantité égale.

PME +, négatif après culture sur VF.

FIG. 47. — *Acin. butyri* G. a.

La différence essentielle entre les deux souches est donc la production pour G. a. d'une PME. Cette enzyme est adaptative, de même que l'endo-PG. Ces deux enzymes unissent leur action et font baisser la viscosité des substrats B. Il n'y a probablement pas de production d'endo-PMG car la baisse de viscosité de B à pH 5,5 serait plus forte en présence d'une telle enzyme. Toutefois, ce n'est qu'une hypothèse et non une certitude.

Cinétique (fig. 47).

La courbe s'abaisse régulièrement mais la pectine n'est digérée que dans un faible pourcentage : 27,5 % en 3 semaines.

Genre *Vibrio*.

Vibrio piger n. sp., souche 24/40.

Cette souche est très peu pectinolytique et ne liquéfie les gels de pectine qu'avec une extrême lenteur. Aussi, la baisse de viscosité des substrats est-elle minime. La chromatographie ne révèle aucune tache.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	80	0,0208
5,5	275	0,0715
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
99	0,00703
120	0,00851
124	0,00880

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité enregistrée.

Chromatographie :

Pas de tache visible.

PME : négatif.

Le germe sécrète, en petite quantité, une endo-PMG adaptative, avec un pH optimum d'action de 7,5.

Cinétique (fig. 48).

Pectinolyse lente et faible : 16,5 % digérés en 7 jours, 22 % en 14 jours, 27,5 % en 3 semaines.

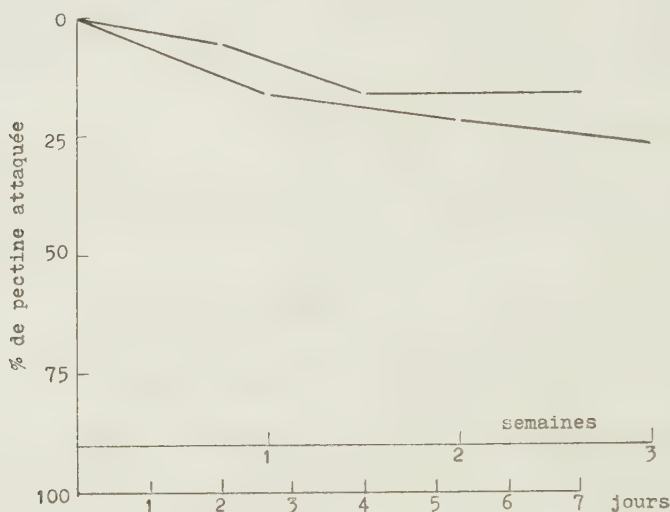


FIG. 48. — *Vibrio piger*.

CONCLUSIONS AU CHAPITRE II

De ces expériences, certaines lois générales peuvent être tirées d'emblée :

1° Toutes les souches étudiées libèrent des enzymes dont le pH optimum d'action est voisin de 7.

2° Les polygalacturonidases sécrétées sont du type endo, attaquant la molécule au hasard.

3° Toutes les souches produisent une endo-PG, c'est-à-dire une polygalacturonidase active sur l'acide pectique et les acides pectiniques (pectine très déméthylée) ; l'action sur les pectines proprement dite est plus rare et variable suivant les espèces. L'attaque des molécules de pectate et de pectinate, par une endo-PG ou une endo-PMG, aboutit à la libération de polyuronides de diverses longueurs, mais surtout des acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques. Lorsque l'incubation du mélange pectine-enzyme à 30° C est prolongée, nous avons remarqué

que les acides tétra- et trigalacturoniques disparaissent ; on ne retrouve plus alors qu'une forte quantité d'acides di- et monogalacturoniques. La pectine méthylestérase est une enzyme assez rare parmi les souches étudiées ; 3 espèces seulement la possèdent et une tout spécialement : *Erwinia betivora*, ce qui n'est pas étonnant car les données des autres auteurs nous montrent que ce groupe de germes est souvent muni d'une telle enzyme (*E. carotovora*, *aroidæ*, etc.). Cette enzyme possède aussi son maximum d'activité à pH 7. Les germes munis d'une endo-PG et d'une PME peuvent attaquer l'acide pectique et la pectine. La PME déméthyle les pectines et les transforme en acides pectique et pectinique qui, à ce moment, peuvent être scindés par une endo-PG. Les techniques que nous employons ne permettent pas ici d'affirmer ou d'infirmer la présence d'une endo-PMG en plus des deux autres enzymes ; en effet, une endo-PG, associée avec une PME abaisse la viscosité de l'acide pectique et des pectines. Deux espèces étudiées sont dans ce cas : *Acinetobacter metalcaligenes* et *butyri*. Quant à *E. betivora*, nous avons vu qu'elle produisait assurément une endo-PMG constitutive alors que la pectinestérase ne l'est pas. Dans le genre *Pseudomonas*, 4 espèces sur 5 donnent une endo-PG et une endo-PMG, mais l'endo-PG est toujours produite en plus grande quantité que la deuxième enzyme. L'endo-PG est adaptative pour *Ps. sauromali* ; pour les 4 autres espèces, elle est constitutive. Dans le genre *Empedobacter*, seuls les gros germes ont des enzymes constitutives (*E. radicum*, *E. arundineti*) ; les germes minces tels que : *E. pectinovorum*, *E. aquatile*, *E. dormitator*, *E. balustinum*, *E. exile* n. sp. et *E. viride* n. sp. ont une endo-PG adaptative. Aucun *Empedobacter* étudié ne donne d'endo-PMG ni de PME. Ces faits concordent bien avec la description originale d'*E. pectinovorum* par Dorey (31).

Xanthomonas vascularum var. *palustris* produit une endo-PG et, en plus faible quantité, une endo-PMG ; celle-ci est adaptative alors que la première semble constitutive.

Dans le groupe des *Achromobactereæ*, l'activité pectinolytique est très variable suivant les différentes espèces ; nous possédons trop peu d'espèces et de souches pour avoir une idée exacte de ce groupe. Seul, *Acin. metalcaligenes* nous donne une endo-PG constitutive.

Enfin, en ce qui concerne *Vibrio piger* n. sp., la baisse très faible de viscosité du substrat R à pH 7,5 dénote une endo-PG adaptative.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sont tout à fait conformes à ceux décrits par Smith (151) et d'autres auteurs. Nous voyons également que les différentes souches agissent, de façon identique, au sein d'une même espèce.

Si ces mesures de viscosité nous renseignent, avant tout, sur la *qualité* de l'activité pectinolytique de chaque germe, la *cinétique* de la

pectinolyse a été étudiée pour nous donner une idée exacte de l'intensité de la pectinolyse au sein de chaque espèce, intensité qui varie beaucoup d'un groupe à l'autre. Nous remarquerons d'abord que la digestion de la pectine se fait plus rapidement les premiers jours ou la première semaine de culture ; ce délai passé, la courbe devient de plus en plus horizontale. L'inclinaison maximum de la courbe correspond simplement à la phase logarithmique de croissance du germe. Nous avons constaté, en effet, que le développement maximum des germes sur ce milieu de culture a lieu, en général, du 3^e au 6^e jour après l'ensemencement.

CHAPITRE III

ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE DES EUBACTÉRIES SPORULÉES

VISCOSITÉ DES SUBSTRATS TÉMOINS A 1 015 MILLIBARS DE PRESSION

	Temps d'écoulement en secondes	=	Viscosité en poises
Substrats R	275	=	0,0715
Substrats B	124	=	0,00880

VISCOSITÉ DE L'EAU A 20° C ET A 1 015 MILLIBARS

Temps d'écoulement sur viscosimètre R : 4 secondes
 Temps d'écoulement sur viscosimètre B : 14,5 secondes = 0,00103 poise.

Bacillales.

Genre *Bacillus*.

Bacillus subtilis : 3 souches typiques ont été sélectionnées ; elles agissent de la même manière :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	6	0,00157
5,5	11	0,00287
4	271	0,0705

Substrat B

Secondes	Poises
35	0,00249
60	0,00427
122	0,00867

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	13	0,00339
5,5	24	0,00625
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
81	0,00576
92	0,00654
124	0,00871

Chromatographie :

R : les acides penta-, tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : les mêmes acides en quantité 4 fois moindre.

PME : négatif.

Nous noterons la présence d'une endo-PG, active surtout à pH 7, constitutive, ainsi qu'une endo-PMG adaptative, en faible quantité. Pas de PME.

Cinétique (fig. 49).

La pectine est détruite principalement pendant les premiers jours de culture. L'hydrolyse ralentit ensuite considérablement 60 % seulement de la pectine sont métabolisés en 3 semaines.

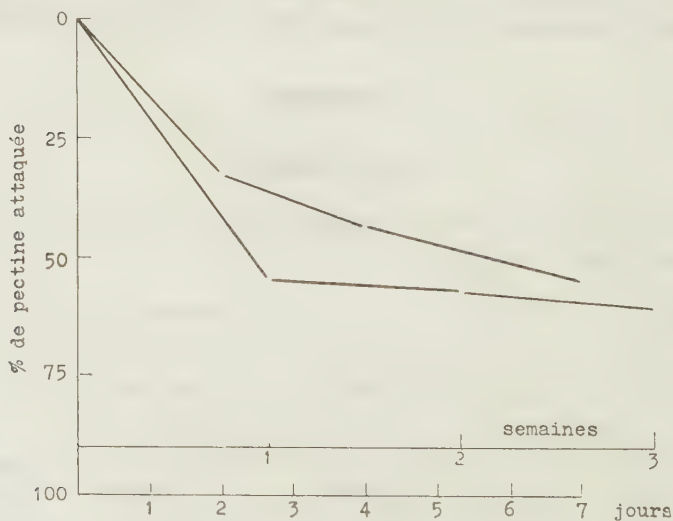


FIG. 49. — *Bacillus subtilis*.

Bacillus salpæ n. sp.

Étude de 3 souches à action similaire :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5,5	0,00143
5,5	7,0	0,00182
4	251	0,0653

Substrat B

Secondes	Poises
20	0,00142
47	0,00334
105	0,00746

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité des substrats.

Chromatographie :

R : les acides penta-, tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : les mêmes acides, en quantité égale à R.

PME : ++, négatif après culture sur VF.

Toutes les enzymes sont adaptatives. Ce germe possède, en tout cas, une endo-PG active à pH 7,5 et une PME. Ici, encore, nous ne pouvons affirmer qu'il existe en plus une endo-PMG.

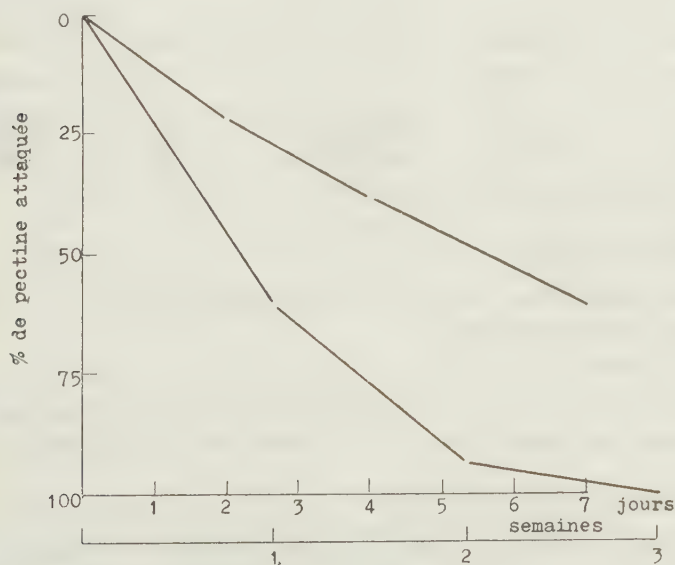


FIG. 50. — *B. salpæ*.

Cinétique (fig. 50).

La courbe traduit la marche régulière de la lyse : 60 % de la pectine ont disparu en 1 semaine, 93,5 % en 2 semaines, 100 % en 3 semaines.

Bacillus pumilus.

Étude de 2 souches isolées de terres de jardin (PpSa, PpS5) et d'une souche de la collection de l'Institut Pasteur. Les trois souches agissent de façon semblable.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5,5	0,00144
5,5	13	0,00339
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
71	0,00505
92	0,00654
124	0,00872

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00261
5,5	21	0,00547
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
75	0,00533
83	0,00590
124	0,00872

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : pas de taches visibles.

PME : négatif.

Nous n'avons qu'une seule enzyme pour ce germe : une endo-PG constitutive et active à pH 7,5. Pas d'endo-PMG, ni de PME.

Cinétique (fig. 51).

C'est un pectinolytique moyen ; au cours des trois semaines de culture, le catabolisme de la pectine est continu et régulier. Première

semaine : 49,5 % de pectine digérée, 66 % la deuxième semaine et 71,5 % lors de la dernière mesure.

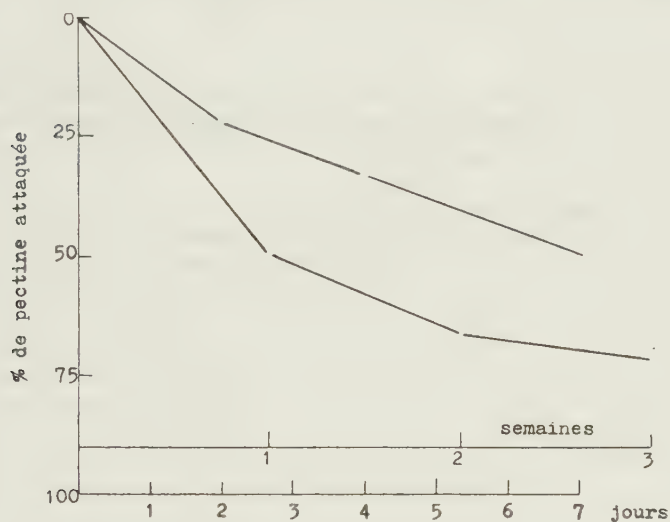


FIG. 51. — *B. pumilus*.

Bacteridium capillosum n. sp.

Une souche de la saupe S19 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8,5	0,00221
5,5	14	0,00364
4	277	0,0720

Substrat B

Secondes	Poises
31	0,00220
42	0,00298
135	0,00959

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité mesurée.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les mêmes acides, en quantité 2 fois moindre.

PME : ++, négatif après culture sur VF.

L'endo-PG et la PME produite sont actives à pH 7,5 surtout et sont adaptatives. Nous ne pouvons pas nous prononcer quant à la présence ou l'absence d'une endo-PMG.

Cinétique (fig. 52).

Pectinolytique extrêmement lent et peu actif. Ce n'est que dans la 3^e semaine de culture que ce germe se développe davantage, l'attaque de la pectine devient alors plus réelle.

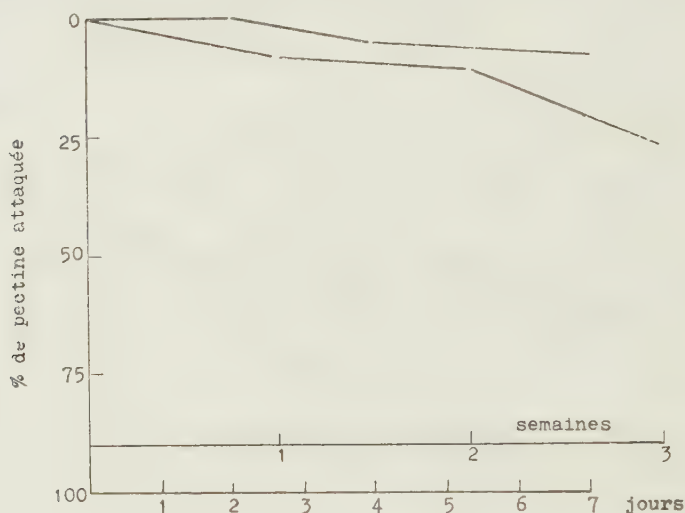


FIG. 52. — *B. capillosum*.

Clostridiales.

Genre *Endosporus*.

E. circulans : nous reportons la moyenne de 5 souches qui agissent de façon similaire :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	7	0,00182
5,5	36	0,00936
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
32	0,00227
55	0,00391
124	0,00880

Après culture sur VF :

Quatre des souches n'abaissent pas la viscosité, une l'abaisse faiblement.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les mêmes acides, en petite quantité.

PME : négatif.

E. circulans produit une endo-PG et, plus faiblement, une endo-PMG adaptatives. Leur pH optimum d'action est de 7,5.

Cinétique (fig. 53).

Pectinolytique actif, courbe régulière ; 66 % de la pectine sont digérés en 1 semaine, 79,7 % en 2 semaines et 85,2 % au bout de 3 semaines.

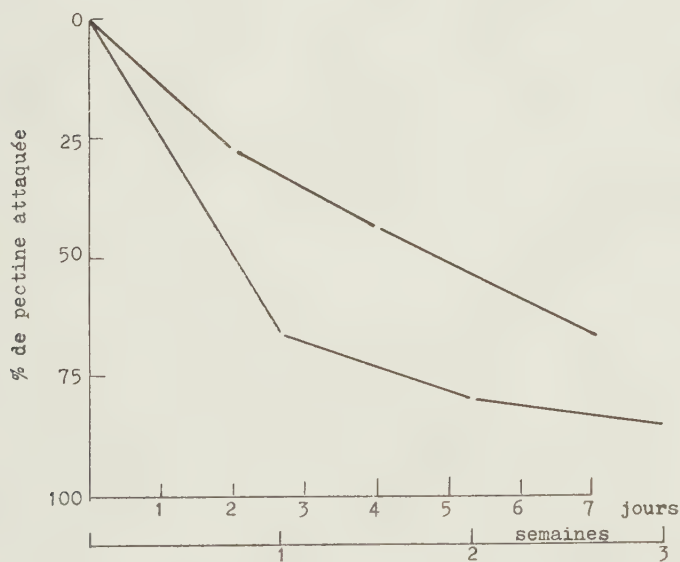


FIG. 53. — *E. circulans*.

E. humi n. sp.

Cinq souches sont étudiées, cultivées sur pectine, elles agissent de manière semblable, mais différemment sur VF.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	7	0,00182
5,5	10	0,00260
4	270	0,0702

Substrat B

Secondes	Poises
26	0,00185
44	0,00312
121	0,00859

Après culture sur VF :

Trois souches ne changent pas la viscosité. Par contre, les souches Vmd5 et MP₁ l'abaissent notablement.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	11	0,00286
5,5	38	0,00988
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
70	0,00497
92	0,00653
124	0,00880

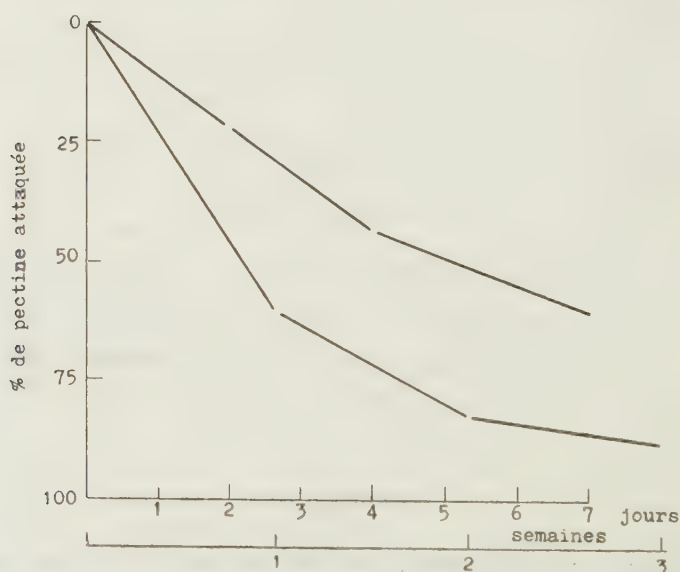


FIG. 54. — *E. humi*.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : mêmes acides, en quantité égale.

PME : négatif.

Le liquide de culture de ce germe contient une endo-PG et une endo-PMG. Pour 3 souches, ces enzymes sont adaptatives. Pour 2 autres souches, l'endo-PG seule est constitutive. L'action optimum a toujours lieu à pH 7,5.

Cinétique (fig. 54).

Courbe à peu près identique à celle de l'espèce précédente.

E. multiplex n. sp.

Deux souches : K4 et RL5' :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00261
5,5	22	0,00573
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
75	0,00534
92	0,00654
124	0,00881

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

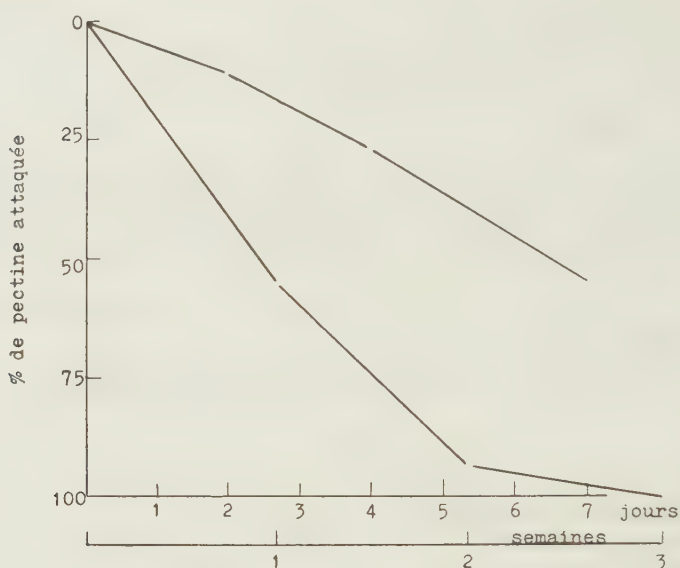
B : tracicules des trois premiers acides.

PME : négatif.

Pour *E. multiplex*, nous ne trouvons qu'une endo-PG, active à pH 7,5 et adaptative.

Cinétique (fig. 55).

Après une phase de digestion ralentie, cette espèce devient très active pour la pectinolyse ; en 2 semaines, la presque totalité de la pectine a disparu.

FIG. 55. — *E. multiplex*.*E. pravus* n. sp.

Une souche : 121 C (Ruwenzori) :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00131
5,5	7	0,00183
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
24	0,00172
42	0,00299
121	0,00860

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité des substrats.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les mêmes acides, en quantité presque aussi forte.

PME : négatif.

E. praeus donne deux enzymes : une endo-PG et une endo-PMG adaptatives et actives à pH 7,5.

Cinétique (fig. 56).

Contrairement au germe précédent, cette espèce est très peu pectinolytique ; 16,5 % seulement de la pectine sont digérés en 3 semaines.

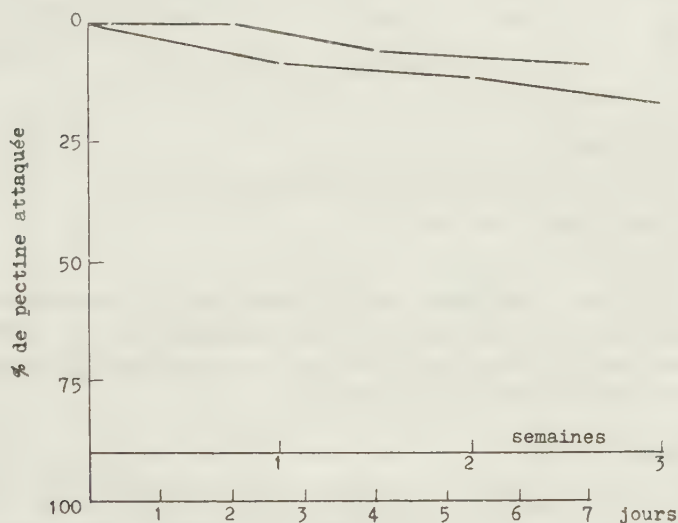


FIG. 56. — *E. praeus*.

Genre *Clostridium*.

Clostridium polymyxa (moyenne de 5 souches).

Étude de 5 souches : 2 souches du Ruwenzori ; 2 des terres françaises et une de la collection de l'Institut Pasteur. Toutes ont une action identique.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	4,5	0,00117
5,5	5,0	0,00130
4	6,0	0,00156

Substrat B

Secondes	Poises
23	0,00163
25	0,00178
81	0,00575

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	6,0	0,00157
5,5	10	0,00261
4	205	0,0534

Substrat B

Secondes	Poises
42	0,00299
55	0,00391
119	0,00846

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : Même résultat que pour R.

PME : négatif.

Cl. polymyxa produit deux enzymes : une endo-PG et une endo-PMG. L'endo-PG est accumulée en si grande quantité que son action se fait aussi sentir à pH 4 mais le pH optimum d'action est toujours de 7,5. Les deux enzymes sont constitutives.

Cinétique (fig. 57).

Milieu pectine, pomme de terre-levure. Sur ce milieu riche, la pectinolyse par *polymyxa* est foudroyante ; 24 heures après l'ensemencement

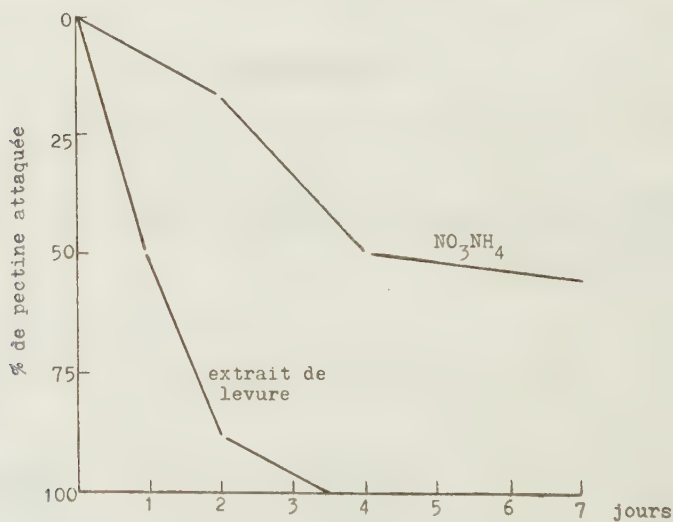


FIG. 57. — *Cl. polymyxa*.

cement, 50 % de pectine sont déjà fermentés, 88 % le 2^e jour ; il ne reste plus trace de pectine le 3^e jour. Toutefois, la courbe suit la loi générale, c'est-à-dire que la fermentation est relativement plus intense le 1^{er} jour que les jours suivants.

Si la levure est remplacée par du nitrate d'ammonium, nous obtenons alors un germe moyennement actif sur la pectine ; 60 % sont digérés après 1 semaine de culture.

Cl. pectinolyticum, souche C8.

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00230
5,5	15	0,00390
4	275	0,0715

Secondes	Poises
59	0,00419
63	0,00447
111	0,00788

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques. Les taches avec B sont deux fois moins grosses qu'avec R.

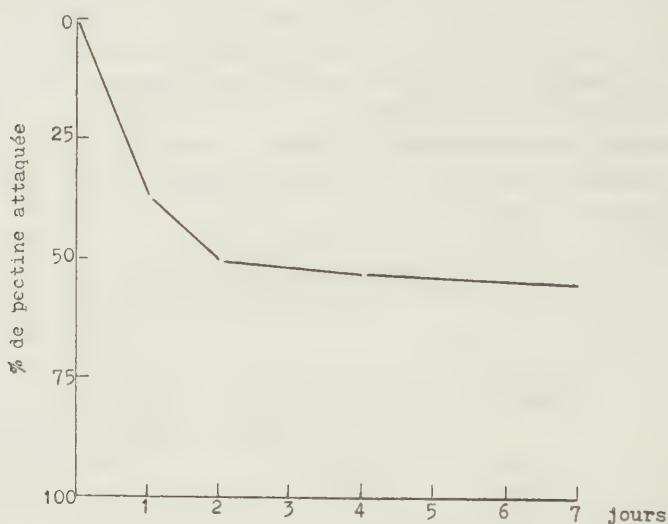
PME : négatif.

Une endo-PG adaptative est sécrétée. Nous soupçonnons également la présence d'une endo-PMG car, sur le chromatogramme, les taches des uronides sont bien visibles avec le substrat B.

Ces taches ne se remarquent pas ou à peine pour les germes qui ne forment qu'une endo-PG. Nous avons constaté à plusieurs reprises l'absence de PME, alors que M. Raynaud (143) observe une réaction positive.

Cinétique (fig. 58).

Si l'on se souvient de l'étude de M. Raynaud (143), on se rendra compte que ce germe a perdu une bonne partie de son pouvoir pectinolytique. L'auteur citait cet anaérobie comme très actif, fermentant 100 % de la pectine en 7 jours. Les viscosités, que nous avons mesurées sur substrats R et B, confirment que ce germe sécrète ses enzymes en petite quantité.

FIG. 58. — *Cl. pectinolyticum* C8.

Clostridium grave n. sp. (souche 18/17).

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00129
5,5	6	0,00155
4	7	0,00181

Substrat B

Secondes	Poises
40	0,00283
44	0,00312
124	0,00879

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5,5	0,00142
5,5	6,0	0,00155
4	7,0	0,00181

Substrat B

Secondes	Poises
44	0,00312
53	0,00376
124	0,00879

Chromatographie :

R : les acides penta-, tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tri- et digalacturoniques en petite quantité.

PME : négatif.

Ce germe produit beaucoup d'endo-PG puisque l'on mesure une forte baisse de viscosité jusqu'à pH 4 ; elle est constitutive. Une endo-PMG constitutive semble également présente mais faiblement. Comme pour toutes les Bactéries, l'action optimum des enzymes a lieu à pH 7,5.

Cinétique (fig. 59).

La pectinolyse est de force moyenne : très active pendant les 2-3 premiers jours, elle ralentit ensuite considérablement. 60 % de la pectine

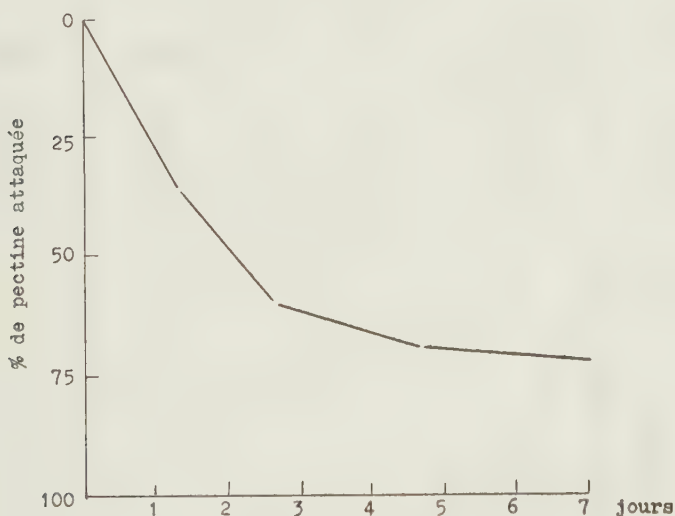


FIG. 59. — *Cl. grave.*

sont digérés en 2 jours et demi, 72 % le sont après une semaine de culture. Ce délai passé, le taux de pectine non digéré reste pratiquement stable.

Clostridium omnivorum, souche T52.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	6,5	0,00169
5,5	9	0,00234
4	75	0,0195

Substrat B

Secondes	Poises
68	0,00483
90	0,00639
123	0,00873

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	24	0,00624
5,5	152	0,0395
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
78	0,00554
85	0,00604
124	0,00880

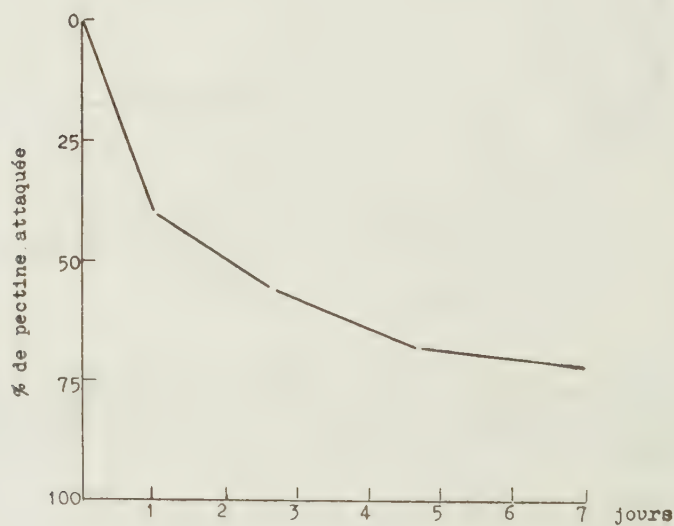


FIG. 60. — *Cl. omnivorum*.

Chromatographie :

R : Les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tri- et digalacturoniques à l'état de traces.

PME : négatif.

Une endo-PG se trouve dans le liquide de culture. On peut dire qu'elle est constitutive, bien qu'elle soit sécrétée en plus petite quantité dans le VF que sur milieu à la pectine.

Cinétique (fig. 60).

Comme pour tous les anaérobies pectinolytiques gazogènes, la phase logarithmique de croissance est brutale et entraîne une perte de la pectine, rapide pendant les premières 48 heures de culture, ensuite la courbe s'abaisse lentement.

Clostridium laniganii.

Moyenne de 9 souches à action similaire (dont 3 du Ruwenzori).

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00131
5,5	6	0,00157
4	110	0,0287

Substrat B

Secondes	Poises
19	0,00136
35	0,00250
105	0,00747

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	9	0,00235
5,5	15	0,00391
4	274	0,0713

Substrat B

Secondes	Poises
48	0,00341
53	0,00377
122	0,00867

Chromatographie :

R : Les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les mêmes acides, en quantité presque égale.

PME : positif (+ ou ++), en général, cette enzyme est très fugace et il faut la rechercher sur cultures très jeunes. Négatif après culture sur VF.

Ce germe possède trois enzymes de la pectinolyse : une endo-PG abondante et constitutive, une PME adaptative, très fugace, et une endo-PMG en plus faible quantité. L'action sur pectine B n'est pas due à l'action conjuguée de l'endo-PG et de la PME car on retrouve endo-PG et endo-PMG alors que la réaction de la PME est devenue négative. L'endo-PMG semble également constitutive.

Cinétique.

La puissance des souches est inégale. Sept sont très pectinolytiques (05/20, 16/49, 118A, T1, JL, TrE3, DE3) digérant 92 % de la pectine

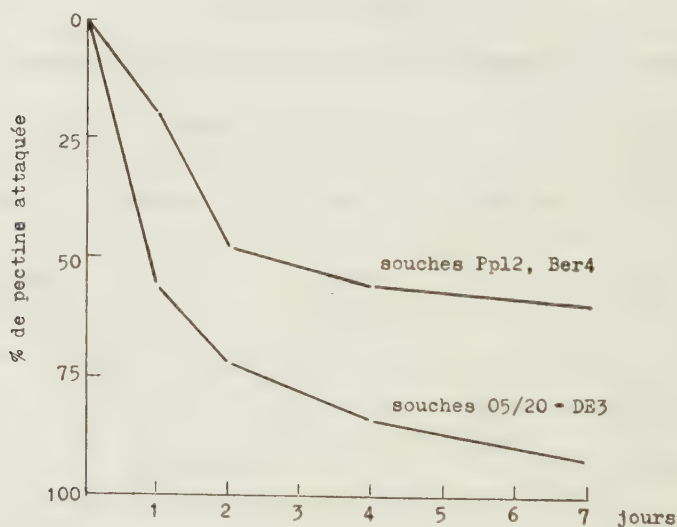


FIG. 61-62. — *Cl. laniganii*.

en 7 jours, alors que 2 autres souches PpL2, Ber4 n'attaquent que 60 % dans la même période. Nous présentons les 2 courbes différentes (fig. 61-62).

Cl. eruptens n. sp.

Étude de 6 souches :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	4,5	0,00117
5,5	5,5	0,00143
4	8,5	0,00221

Substrat B

Secondes	Poises
70	0,00497
77	0,00547
89	0,00632

Après culture sur VF :

Deux souches : J., 314, ne produisent aucune enzyme pectinolytique sur VF. Les 4 autres abaissent la viscosité de façon variable. Nous reportons ici la moyenne de ces 4 souches :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00260
5,5	35	0,00910
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
78	0,00554
95	0,00675
124	0,00880

Chromatographie :

R : Les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

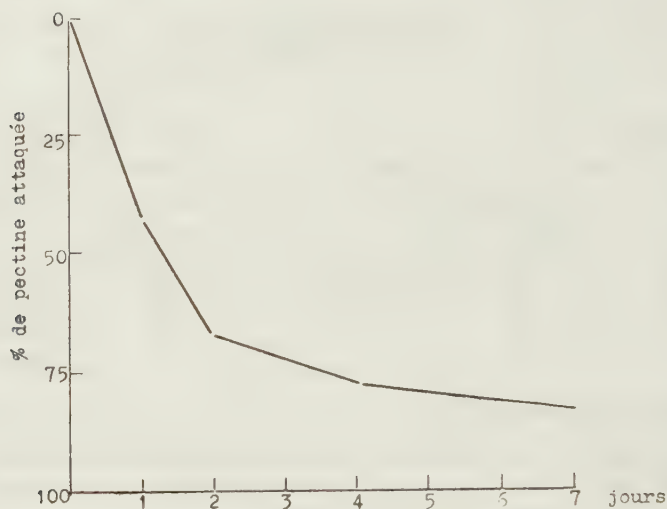
B : tracicules des 3 premiers acides.

PME : négatif.

Avant tout, production d'une endo-PG, en grande quantité, puisque la baisse de viscosité est notable à pH 4. L'action maximum se fait, comme toujours, à pH 7,5. Pour 4 souches, cette enzyme est constitutive ; pour 2 autres souches, elle est adaptative. Pas d'endo-PMG, ni de PME.

Cinétique (fig. 63).

C'est un bon pectinolytique ; de même que pour les autres anaérobies, la pectinolyse est intense pendant 2 premiers jours de culture puis ralentit beaucoup. En 48 heures, 67 % de la pectine ont disparu, 83 % en 7 jours.

FIG. 63. — *Cl. eruptens*.*Cl. aurantibutyricum*.

Une souche : Weizmann, de la collection du Service des anaérobies.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00130
5,5	5,5	0,00143
4	8	0,00208

Substrat B

Secondes	Poises
17	0,00121
19	0,00135
45	0,00320

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00208
5,5	8,5	0,00221
4	10	0,00260

Substrat B

Secondes	Poises
33	0,00234
45	0,00320
61	0,00433

Chromatographie :

R : Les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les mêmes acides, en quantité égale.

PME : +, enzyme très fugace, qui ne se montre que sur cultures jeunes (24 heures) ; négatif après culture sur VF.

Ce germe très pectinolytique possède les trois enzymes classiques : endo-PG, endo-PMG et PME. Les deux premières sont constitutives, la PME est adaptative. L'action sur substrat B reste aussi intense après la disparition de la PME, ce qui prouve la réelle existence de l'endo-PMG. Toutes sont actives, surtout à pH 7,5.

Cinétique (fig. 64).

C'est avec *Cl. polymyxa*, le pectinolytique le plus actif, puisque la presque totalité de la pectine est digérée en 4 jours. Ceci concorde bien

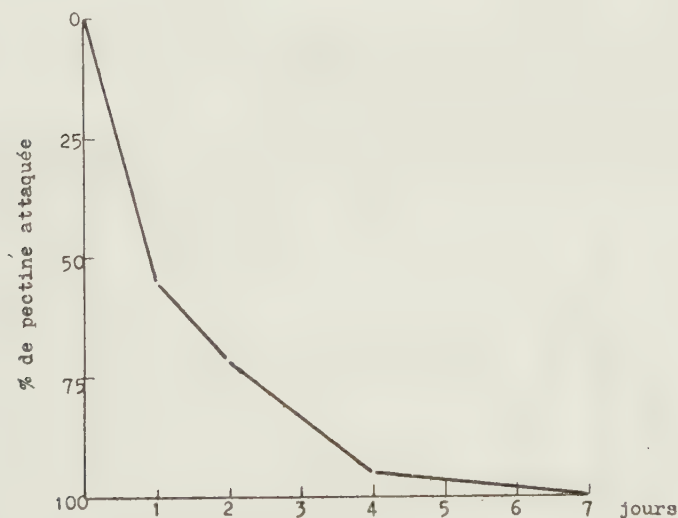


FIG. 64. — *Cl. aurantibutyricum*.

avec les données de M. Raynaud et A.-R. Prévot qui ont pris ce germe comme tête de file des *Clostridium pectinolytiques* (sous-genre : *Cl. aurantibutyricum*) à cause de son activité pectinolytique intense.

Cl. felsineum var. *flavum* nv. var.

Une souche : Dax.

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises		Secondes	Poises
7,5	5,0	0,00130		16,5	0,00117
5,5	4,5	0,00117		14,5	0,00103
4	5,0	0,00130		20	0,00142

Culture sur eau peptonée-levure glucosée (ne se cultive pas sur VF).
Aucune baisse de viscosité observée.

Chromatographie :

R : Les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : Les mêmes acides, en quantité égale.

PME : +, négatif sur milieu sans pectine.

Ce germe possède, comme le précédent, les trois enzymes en grande quantité car les viscosités obtenues sont à leur minimum. Endo-PG,

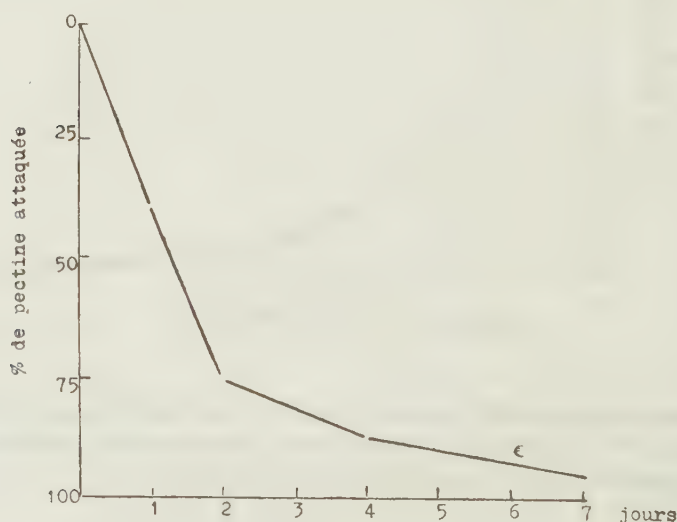


FIG. 65. — *Cl. felsineum* var. *flavum*.

endo-PMG et PME sont adaptatives. Le pH optimum d'action semble toutefois abaissé à 5,5 environ.

Cinétique (fig 65).

Pectinolytique très actif : digère en 48 heures, 75 % de la pectine mise en œuvre. Suivant le schéma classique, la courbe s'abaisse ensuite lentement et en 7 jours la pectine a disparu presque toute.

Cl. opertum n. sp.

Une souche : ATCC 824.

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises		Secondes	Poises
7,5	4,5	0,00118		50	0,00356
5,5	5,5	0,00144		59	0,00420
4	6,5	0,00170		74	0,00568

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité des substrats.

Chromatographie :

R : les acides tri-, di- et monogalacturoniques.

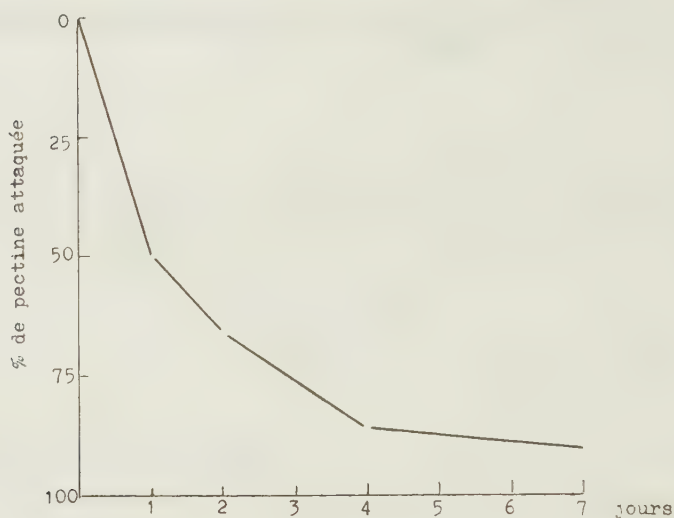
B : aucune tache visible.

PME : négatif.

Cet anaérobie ne produit qu'une seule enzyme en abondance : une endo-PG ; adaptative, avec pH optimum de 7,5. La baisse de viscosité des substrats B provient sans doute du résidu d'action de l'endo-PG sur substrat B ; la chromatographie le confirme : il n'y a aucune tache avec B.

Cinétique (fig. 66).

De nouveau cet anaérobie est un bon pectinolytique ; digestion brutale de la pectine pendant les premiers jours de culture. 86 % sont digérés en 4 jours, 90 % en une semaine.

FIG. 66. — *Cl. opertum*.***Plectridiales.****Terminosporus sphæricus* (*Bacillus sphæricus*).

Souche Cpr6 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	20	0,00521
5,5	275	0,0716
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
60	0,00427
95	0,00676
124	0,00881

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité des substrats.

Chromatographie :

R : Aucune tache visible.

B : *idem*.

PME : négatif.

Bactérie peu pectinolytique ; la baisse de viscosité, à pH 7,5, sur R est faible et la chromatographie ne nous révèle aucune tache car la pectine est trop peu dégradée. Il s'agit probablement d'une endo-PG adaptative, produite en petite quantité.

Cinétique.

On ne constate pas de disparition de la pectine malgré une faible baisse de viscosité. Le germe est donc peu pectinolytique.

Plectridium pectinovorum.

Moyenne de 6 souches à action similaire (06/11, 05/40 du Ruwenzori, Braz 1 de l'Afrique Centrale, PC souche originelle et les souches Trsb et RL3 des terres françaises).

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	7,5	0,00195
5,5	11	0,00286
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
20	0,00142
24	0,00170
109	0,00774

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00130
5,5	6	0,00156
4	10	0,00260

Substrat B

Secondes	Poises
20	0,00142
23	0,00163
64	0,00454

Chromatographie :

R : Les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : Mêmes acides en quantité égale.

PME : négatif.

Les 6 souches donnent des résultats très homogènes. Sur acide pectique et sur pectine, ce germe est actif grâce à une endo-PG et une endo-PMG. Celles-ci sont constitutives ; il est même étonnant de cons-

tater qu'il existe davantage d'enzymes sur VF que sur pectine. Peut-être, le milieu VF contient-il des protéines qui sont des précurseurs de ces enzymes ? Ce n'est qu'une hypothèse.

Cinétique (fig. 67).

Cl. pectinovorum est un pectinolytique très moyen. M. Raynaud l'avait constaté et la courbe suivante nous le prouve : elle s'abaisse régulièrement jusqu'au 4^e jour de culture, 58 % de pectine sont alors digérées ; au bout de 7 jours, 66 % de la pectine mise en œuvre ont disparu.

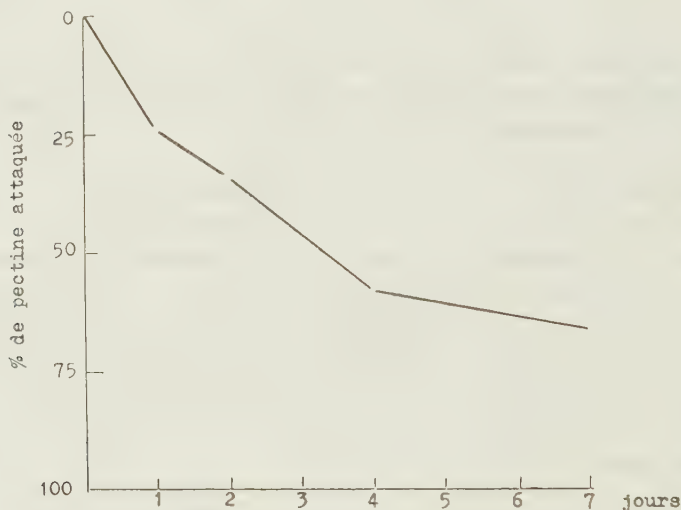


FIG. 67. — *Pl. pectinovorum*.

Pl. pectinovorum var. *butyricum*.

Souche PJ de Weizmann :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	15	0,00391
5,5	76	0,00198
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
78	0,00555
95	0,00676
124	0,00881

Après culture sur VF :

Aucune baisse de viscosité des substrats.

Chromatographie :

R : Tracicules de polyuronides (vraisemblablement les acides tétra- et trigalacturoniques).

B : pas de tache.

PME : négatif.

Nous voyons que ce germe diffère notablement du véritable *pectinovorum* ; son unique enzyme, une endo-PG, est adaptative et sécrétée en petite quantité.

Cinétique (fig. 68).

C'est un germe peu pectinolytique, digérant la pectine lentement et très incomplètement : 50 % sont attaqués en 7 jours. Ces faits concordent bien avec les observations de Weizmann et de M. Raynaud.

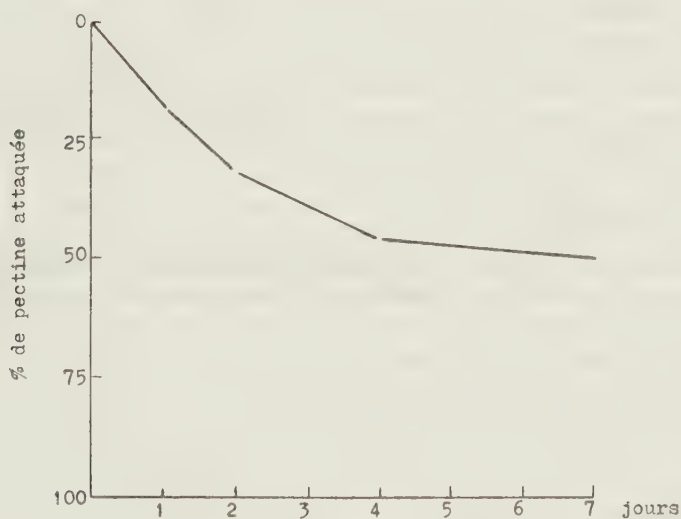


FIG. 68. — *Pl. pectinovorum* var. *butyricum*.

Plectridium virens, souche PN6 (du Service des anaérobies).

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00208
5,5	22	0,00572
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
38	0,00270
58	0,00412
106	0,00753

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	12	0,00312
5,5	65	0,0169
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
37	0,00263
45	0,00320
123	0,00873

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : identique à R.

PME : négatif.

Le germe, qui est un pectinolytique lent, possède les deux enzymes classiques : l'endo-PG et l'endo-PMG, constitutives. L'optimum d'action est toujours à pH 7,5.

Cinétique (fig. 69).

Pectinolytique lent, ceci est dû à la croissance lente et peu abondante du germe. Cependant, sa courbe est à l'image de celle des anaérobies

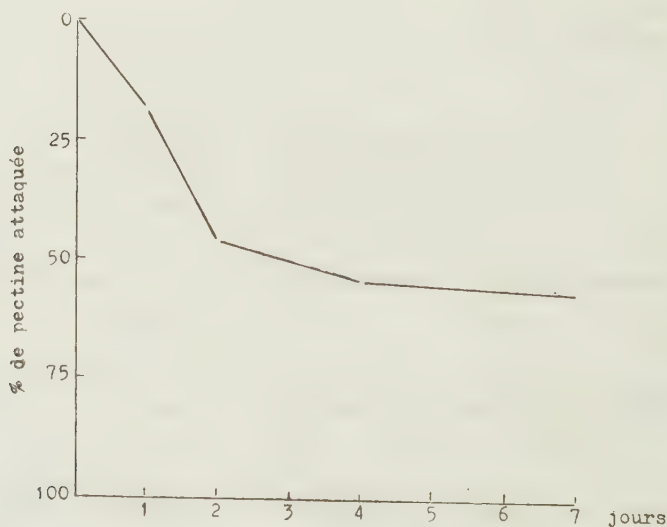


FIG. 69. — *Pl. virens*

stricts : brusque descente au début de la culture et arrêt assez brutal, la courbe s'abaisse alors peu à peu. En 48 heures, 46 % de la pectine sont digérés, 56 % en 7 jours.

CONCLUSIONS AU CHAPITRE III

Les Sporulales, dans l'ensemble, n'agissent pas différemment des Asporulales, la souche Dax de *Cl. felsineum* exceptée, toutes les souches étudiées montrent un pH optimum d'action à 7,5 et possèdent également une endo-PG. La présence d'endo-PMG varie suivant l'espèce en cause. Ici encore, la PME est une enzyme assez rare ; quelques anaérobies la possèdent mais elle est fugace chez ces germes ; il faut la rechercher dans les cultures jeunes de 24 heures. Nous noterons d'ailleurs que cette enzyme est toujours adaptative.

Les *Endosporus* se distinguent par une activité pectinolytique régulière, bonne pour certaines espèces, très faibles pour d'autres. Ils forment contraste avec les *Clostridium* que nous étudions tout de suite après et qui ont une activité brutale et puissante. *Clostridium polymyxa* digère en 3 jours 100 % de la pectine mise en œuvre ; *Cl. aurantibutyricum* : 100 % en moins de 7 jours. C'est là aussi ce qui distingue les anaérobies gazogènes et pectinolytiques des germes aérobies sporulés et asporulés. Tandis que ces derniers diminuent régulièrement le taux de pectine, au cours des jours de la culture, les anaérobies abaissent la courbe de la pectinolyse brutalement pendant les premières 48 heures de culture ; chez ces derniers, la digestion est ensuite beaucoup plus lente et devient comparable à celle des aérobies. Ces faits s'expliquent facilement si on observe le mode de croissance des deux groupes. Les anaérobies ont une phase logarithmique de croissance explosive dans les 48 heures après l'ensemencement, et, c'est à ce moment que disparaît la plus grande partie de la pectine, alors que les aérobies étudiés poussent moins vite, entraînant ainsi une digestion moins forte de pectine.

CHAPITRE IV

MYXOBACTÉRIES

Les 3 souches d'*Angiococcus disciformis* n'étant plus viables, cette étude n'a été faite que très incomplètement. Les quelques résultats obtenus par ce pectinolytique énergique sont cependant intéressants.

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	4,5	0,00116
5,5	5,5	0,00142
4	8,5	0,00220

Substrat B

Secondes	Poises
18	0,00126
19	0,00134
26	0,00184

Après culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00129
5,5	6	0,00155
4	7	0,00181

Substrat B

Secondes	Poises
19	0,00134
23	0,00162
35	0,00247

PME : + + + , négatif après culture sur VF.

Ce germe possède trois enzymes : une endo-PG, une endo-PMG ainsi qu'une PME. D'après les chiffres obtenus, nous voyons qu'endo-PG et endo-PMG sont produites en grande quantité dans le liquide de culture, aussi leur action se fait-elle sentir jusque dans les pH acides. Le pH

optimum d'action reste toutefois à 7,5. Ces deux enzymes sont constitutives ; seule la PME ne l'est pas.

La cinétique n'a pas été étudiée à temps, mais nous nous sommes aperçu, par quelques sondages, que la pectine était digérée à 100 % en moins de 10 jours. C'est donc un pectinolytique énergique.

Cette considération ne s'étend, bien entendu, qu'à cette espèce, non à toutes les Myxobactéries pectinolytiques qui agissent entre elles, aussi différemment peut-être, que le font les Bactéries.

CHAPITRE V

ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE DES ACTINOMYCÈTES

(Genre *Streptomyces*).

Malgré l'impossibilité d'une détermination exacte des espèces d'Actinomycètes, nous avons tenu à étudier les enzymes de la pectinolyse de ces germes, ce domaine n'ayant été jusqu'ici exploré par aucun auteur. Nous avons choisi 24 souches de *Streptomyces*, parmi celles qui sont le plus couramment isolées dans le sol et différentes les unes des autres par l'aspect de leur colonie. Nous n'avons pas pu tracer de courbes de la cinétique de la pectinolyse car ces germes ne poussent pas dans le milieu d'une façon homogène comme les Bactéries, mais forment une croûte en surface du liquide ; lors d'un prélèvement pour un dosage, la croûte sombre au fond du tube ; la croissance et la pectinolyse sont alors brusquement freinées et repartent difficilement. Aussi il n'a été effectué qu'un dosage de la pectine résiduelle, après 10 jours de culture. Nous exprimons en pourcentage le taux de pectine digérée dans ce laps de temps.

VISCOSITÉ DES SUBSTRATS TÉMOINS A 1 015 MILLIBARS DE PRESSION

	Temps d'écoulement en secondes	Viscosité en poises
	—	—
Substrats « R ».....	275	0,0715
Substrats « B ».....	124	0,00880

VISCOSITÉ DE L'EAU A 20° C ET A 1 015 MILLIBARS (0,00103 poise).

Temps d'écoulement sur viscosimètre R : 4 secondes.

Temps d'écoulement sur viscosimètre B : 14,5 secondes.

Souche P5 (A) :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0716
5,5	275	0,0716
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
45	0,00320
101	0,00718
124	0,00881

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité observée.

Chromatographie :

R et B : pas de tache.

PME : ++ à pH 7,5, négatif sur VF.

Pourcentages de pectine digérée en 10 jours : 52 %.

Dans ces mesures, on dénote une contradiction : aucune baisse de viscosité des substrats R n'est observée, pourtant 52 % de la pectine sont digérés en 10 jours. C'est que l'endo-PG est produite en petite quantité et la baisse de viscosité qu'elle pourrait provoquer sur R est masquée par une forte augmentation de la viscosité due à la PME.

Une petite quantité d'endo-PMG se trouve sans doute aussi dans le liquide de culture. Les trois enzymes sont adaptatives. Le manque de tache sur le chromatogramme nous indique que les polygalacturonidases sont produites en faible quantité. Il s'agit sûrement d'endoenzymes.

Souche CrL5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00209
5,5	103	0,0322
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
60	0,00427
95	0,00675
124	0,00881

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : traces d'acides tri- et digalacturoniques.

B : pas de tache.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 62 %.

Production d'une endo-PG adaptative, avec pH optimum d'action à 7,5.

Souche P6 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	11	0,00287
5,5	275	0,0716
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
51	0,00363
97	0,00690
124	0,00881

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R et B : pas de tache visible.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 42 %.

Enzymes : endo-PG et endo-PMG en petite quantité, adaptatives, actives à pH 7,5.

Souche P5B :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0715
5,5	275	0,0715
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
29	0,00206
87	0,00618
99	0,00703

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : pas de tache visible.

B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

PME : ++ à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 55 %.

Comme pour la première souche étudiée, la PME masque l'activité de l'endo-PG, certainement présente puisque 55 % de la pectine R sont digérés. Mais, de même que le montre la chromatographie, l'endo-PG est peu abondante alors que l'endo-PMG est produite en plus grande quantité. Les trois enzymes sont adaptatives et actives surtout à pH 7,5.

Souche P5C :

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises		Secondes	Poises
7,5	275	0,0715		25	0,00178
5,5	275	0,0715		88	0,00625
4	275	0,0715		124	0,00880

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : pas de tache.

B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

PME : + à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 57 %.

Nous nous trouvons dans le même cas que la souche précédente : endo-PG en petite quantité, dont l'action est masquée par une PME ; endo-PMG en plus forte quantité. Les trois enzymes sont adaptatives et actives à pH 7,5 surtout.

Souche CrL5' :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	7	0,00182
5,5	150	0,0390
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
19	0,00135
66	0,00469
105	0,00746

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : ++ à pH 7,5 , négatif sur VF.

Digestion de la pectine en 10 jours : 74 %.

Lors d'un premier essai, nous n'avions observé aucune baisse de viscosité sur substrat R. C'est seulement en prenant une culture plus jeune que nous avons obtenu ce résultat. L'endo-PG est donc assez fugace et produite en plus petite quantité que l'endo-PMG. Quelques souches précédentes ont déjà réagi de la même manière. Les trois enzymes produites sont adaptatives et actives à pH 7,5.

Souche Ech4 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0715
5,5	275	0,0715
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
21	0,00149
51	0,00362
112	0,00795

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : pas de tache.

B : les acides tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : ++ à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 42 %.

Enzymes : endo-PMG et PME, peu d'endo-PG. Toutes les trois sont adaptatives et actives à pH 7,5.

Souche K :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	11	0,00287
5,5	275	0,0716
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
40	0,00285
85	0,00604
124	0,00881

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R, B : pas de tache visible.

PME : + faible à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 8 %.

Enzymes : petite quantité d'endo-PG et de PME et peut-être d'endo-PMG, mais la baisse de viscosité de B peut résulter de l'action conjuguée des deux premières enzymes. Celles-ci sont adaptatives et actives à pH 7,5. C'est une souche faiblement pectinolytique.

Souche Sar5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	11	0,00285
5,5	275	0,0714
4	275	0,0714

Substrat B

Secondes	Poises
34	0,00240
80	0,00567
124	0,00879

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R et B : pas de tache visible.

PME : + faible à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 42 %.

Enzymes : comme pour la souche précédente.

Souche All :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	12,5	0,00325
5,5	275	0,0715
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
34	0,00241
85	0,00604
124	0,00880

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R et B : pas de tache visible.

PME : + faible à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 67 %.

Enzymes : identiques au cas précédent : endo-PG et PME, peut-être une endo-PMG, enzymes adaptatives et actives à pH 7,5.

Souche All5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	11	0,00285
5,5	275	0,0714
4	275	0,0714

Substrat B

Secondes	Poises
32	0,00226
78	0,00553
115	0,00814

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R et B : pas de tache visible.

PME : + faible à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 68 %.

Enzymes : endo-PG et PME, peut-être aussi une endo-PMG. Enzymes adaptatives, actives à pH 7,5.

Souche T5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5,5	0,00143
5,5	270	0,0702
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
44	0,00312
83	0,00589
120	0,00852

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographic :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : pas de tache visible.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 76 %.

Ce germe est surtout actif sur acide pectique grâce à une endo-PG adaptative, active à pH 7,5. Peu d'action sur pectine. Une endo-PMG existe peut-être en faible quantité, mais il s'agit vraisemblablement du résidu d'activité de l'endo-PG sur substrat B. Pas de PME. C'est un bon pectinolytique puisque 75 % de la pectine sont digérés.

Souche Psb5' :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00260
5,5	275	0,0715
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
42	0,00298
103	0,00731
120	0,00852

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : tracicules d'acides tri- et digalacturoniques.

B : pas de tache visible.

PME : + à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 54 %.

Lors d'une première mesure, sur une culture trop âgée, nous n'avions obtenu aucune baisse de viscosité des substrats R, mais une baisse, faible il est vrai, sur B. Nous pensons donc que ce germe produit endo-PG et endo-PMG en petite quantité. Les trois enzymes sont adaptatives et actives à pH 7,5 surtout.

Souche Nsb5'' :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0716
5,5	275	0,0716
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
45	0,00321
87	0,00619
124	0,00881

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R, B : pas de tache visible.

PME : ++ à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 57 %.

La PME est très active et, de ce fait, contrecarre l'activité des endo-PG et endo-PMG. Ces trois enzymes sont adaptatives et actives à pH 7,5 surtout.

Souche Psb5''.

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises
7,5	6,5	0,00168
5,5	275	0,0714
4	275	0,0714

Secondes		1) Poises	2) Poises
1)	2)		
60	28	0,00425	0,00198
110	67	0,00780	0,00474
124	124	0,00879	0,00879

PME — PME +

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : tracicules des mêmes acides.

PME : + à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 74 %.

Une première mesure sur une vieille culture donnait une réaction négative pour la PME et peu de baisse sur substrat B. Lorsqu'une deuxième mesure a été effectuée sur une culture plus jeune, la PME était positive et la baisse de viscosité sur B importante. Nous voyons ainsi clairement que l'attaque de B est due, en réalité, à l'action conjuguée d'une endo-PG et d'une PME. Toutes les deux sont adaptatives et actives à pH 7,5. Le taux de pectine digérée est assez important.

Souche Ech :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	12	0,00313
5,5	275	0,0716
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
34	0,00242
95	0,00676
118	0,00839

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R et B : pas de tache visible.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 42 %.

C'est un germe peu pectinolytique qui produit peu d'endo-PG et d'endo-PMG ; enzymes adaptatives et actives à pH 7,5.

Souche Nsb5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	760	0,198
5,5	575	0,150
4	297	0,0773

Substrat B

Secondes	Poises
456	0,0324
105	0,00746
124	0,00881

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R et B : pas de tache visible.

PME : ++ à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 52 %.

Ici l'activité PME, très forte, masque complètement l'activité assez faible des PG. Mais ces dernières n'en sont pas moins présentes puisque 52 % de pectine R sont digérés. Il s'agit sans doute d'une endo-PG. Enzymes adaptatives.

Souche Vm5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	12	0,00313
5,5	275	0,0716
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
36	0,00257
93	0,00661
123	0,00874

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R et B : tracicules de polyuronides (tétra à digalacturoniques).

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 46 %.

C'est un pectinolytique très moyen, qui produit une endo-PG et une endo-PMG, adaptatives, avec activité optimum à pH 7,5.

Souche Psb7 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	13	0,00339
5,5	275	0,0716
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
26	0,00186
82	0,00583
124	0,00881

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R et B : pas de tache visible.

PME : + à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 72 %.

Nous n'avons obtenu, lors d'une première mesure, ni baisse de viscosité sur B, ni PME. Au moment de la deuxième mesure avec une culture plus jeune, la réaction de la PME était positive et nous constatons une baisse de viscosité importante sur B. Il est donc probable que ce germe produise une endo-PG et une PME ; mais pas d'endo-PMG ; enzymes adaptatives, action optima à pH 7,5.

Souche M3a :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00131
5,5	60	0,0157
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
24	0,00191
57	0,00406
115	0,00818

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 66 %.

Production d'une endo-PG et d'une endo-PMG adaptatives et actives à pH 7,5.

Souche Psb4'' :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	5	0,00131
5,5	110	0,0287
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
27	0,00193
80	0,00569
124	0,00881

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra- et trigalacturoniques en petite quantité.

PME : ++ à pH 7,5, négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 72 %.

Ce pectinolytique produit trois enzymes adaptatives et actives à pH 7,5 : une endo-PG, une endo-PMG et une PME. Lorsqu'une première mesure a été faite sur une culture plus vieille, la PME avait disparu mais la baisse de viscosité sur B demeurerait aussi importante ; on peut affirmer que les trois enzymes sont présentes.

Souche VM5' :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00260
5,5	275	0,0715
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
36	0,00255
91	0,00646
124	0,00880

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R et B : tracicules de polyuronides mal délimités (probablement les acides tétra- et trigalacturoniques).

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 46 %.

Production peu importante d'une endo-PG et d'une endo-PMG, adaptatives, maximum d'activité à pH 7,5.

Souche M4 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00208
5,5	270	0,0702
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
57	0,00405
82	0,00582
123	0,00873

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques en petite quantité.

B : pas de tache visible.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 60 %.

Enzymes : endo-PG adaptative, pH optimum : 7,5.

Souche Ech4' :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00208
5,5	275	0,0715
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
33	0,00234
75	0,00533
115	0,00817

Après culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : traces des mêmes acides.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 46 %.

Production faible d'endo-PG et d'endo-PMG adaptatives, actives à pH 7,5. C'est un germe peu pectinolytique.

CONCLUSIONS AU CHAPITRE V

La répartition des diverses enzymes de la pectinolyse est très variable au sein de ces différentes souches. Cependant, quelle que soit l'enzyme produite, l'activité optimum est toujours à pH 7,5. Toutes les polygalacturonidases sont du type *endoenzyme* et les souches possèdent, chacune, une endo-PG. Jusqu'ici nous croyons que ces microorganismes réagissent comme les Bactéries. La différence la plus marquée avec celles-ci est la production beaucoup plus fréquente de PME : sur 24 souches étudiées, 15 la possèdent. La présence d'une endo-PMG varie aussi d'une espèce à l'autre. Toutefois, pour 3 souches d'Actinomycètes, cette enzyme est produite de préférence à l'endo-PG. Ces souches attaqueront plutôt les pectines que l'acide pectique.

Dans beaucoup de cas, la présence de PME rend difficile la reconnaissance de l'endo-PMG. Aucune des 24 souches ne produit d'enzyme constitutive ; c'est encore un caractère qui distingue ces microorganismes des Bactéries parmi lesquelles maintes espèces forment des enzymes constitutives. Dans l'ensemble, les Actinomycètes digèrent lentement la pectine.

Le taux de pectine attaqué en 10 jours par la moyenne des 24 souches est de 60 %. Le taux inférieur de digestion est en général de 42 % (8 % pour une seule souche). Le taux supérieur se situe entre 70 et 76 %.

Nous pouvons dire que l'activité pectinolytique des Actinomycètes du sol se rapproche beaucoup de celle des Bactéries (endo-PG et PMG, avec activité optimum à pH 7,5). La production plus fréquente de PME (adaptative, active à pH 7,5), l'adaptivité des enzymes produites différencient les *Streptomyces* des Bactéries. Le taux de digestion de la pectine, en fonction du temps, semble plus faible pour les Actinomycètes mais reste voisin de celui des Bactéries aérobies en général.

CHAPITRE VI

ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE DES CHAMPIGNONS

Contrairement aux Actinomycètes, les Champignons ont été très bien étudiés sur le plan de l'enzymatique. Cependant, il nous a paru bon, pour les raisons ci-dessous énoncées, de refaire un bilan de leur activité pectinolytique. L'emploi des techniques empruntées aux chapitres précédents nous permettra de mieux comparer ce groupe à ceux déjà décrits. De plus, ainsi que nous l'avons vu dans l'historique, les Champignons étudiés par d'autres auteurs sont, le plus souvent, des espèces phytopathogènes peu répandues au sein du sol. Pour avoir une idée exacte de ce qui se passe dans la terre, nous avons sélectionné 25 souches de Champignons inférieurs, les plus fréquemment isolées, et aussi différentes que possible les unes des autres (aspect de la colonie).

De même que pour les Actinomycètes, et pour les mêmes raisons, nous n'avons fait qu'un dosage de la pectine résiduelle après 10 jours de culture.

VISCOSITÉ DES SUBSTRATS TÉMOINS A 1 015 MILLIBARS DE PRESSION

	Temps d'écoulement en secondes	Viscosité en poises
Substrats « R ».....	275	0,0715
Substrats « B ».....	124	0,00880

VISCOSITÉ DE L'EAU A 20° C ET A 1 015 MILLIBARS (0,00103 poise).

Temps d'écoulement sur viscosimètre « R » : 4 secondes.

Temps d'écoulement sur viscosimètre « B » : 14,5 secondes.

Souche VC6 :

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises
7,5	12	0,00313
5,5	12	0,00313
4	12	0,00313

Secondes	Poises
20	0,00143
20	0,00143
57	0,00405

Après culture sur VF :

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises
7,5	13	0,00338
5,5	13	0,00338
4	15	0,00390

Secondes	Poises
28	0,00199
29	0,00206
55	0,00391

Chromatographie :

R : traces de polyuronides (vraisemblablement les acides tétra- et tri-galacturoniques).

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : — à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 65 %.

Trois enzymes sont produites : une endo-PG en petite quantité, constitutive, probablement active à pH 7,5 ; toutefois, le pH optimum d'action semble peu défini. Sans doute existe-t-il deux endo-PG : l'une active à pH 7,5, l'autre à pH 4. Une endo-PMG constitutive et active à pH 7,5 est produite plus abondamment. La PME adaptative est active à pH 5,5 mais non à pH 7,5.

Souche Ppl4' :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	40	0,0105
5,5	280	0,0729
4	280	0,0729

Substrat B

Secondes	Poises
19	0,00136
18	0,00129
18	0,00129

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	9	0,00234
5,5	9	0,00234
4	10	0,00260

Substrat B

Secondes	Poises
46	0,00327
51	0,00362
67	0,00476

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 83 %.

Enzymes : endo-PG constitutive, active surtout à pH 7,5 ; endo-PMG plutôt adaptative, avec pH d'action mal défini, probablement à pH 7,5. Enfin, une PME adaptative, active à pH 5,5, non à pH 7,5.

Souche TR3 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	7,5	0,00196
5,5	10	0,00261
4	20	0,00521

Substrat B

Secondes	Poises
35	0,00250
45	0,00321
70	0,00498

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	11	0,00286
5,5	35	0,00910
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
50	0,00355
55	0,00391
110	0,00781

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : les mêmes acides, en plus petite quantité.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 55 %.

Production d'une endo-PG et d'une endo-PMG. La première est constitutive alors que la seconde semble adaptative. Le pH optimum des deux enzymes est de 7,5. Pas de PME.

Souche Ppl4 (1) :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	385	0,101
5,5	525	0,138
4	510	0,134

Substrat B

Secondes	Poises
128	0,00910
165	0,0118
155	0,0111

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	41	0,0107
5,5	56	0,0146
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
75	0,00533
85	0,00604
124	0,00880

Chromatographie :

R et B : pas de tache visible.

PME : + + + + à pH 5,5,

+ faible à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 40 %.

La PME adaptative active surtout dans les pH acides et, produite en grande quantité, masque complètement l'action des autres enzymes. Une endo-PG existe certainement, puisque 40 % de la pectine R sont digérés en 10 jours. Cependant, toutes les enzymes sont adaptatives.

Souche Vc4 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	385	0,101
5,5	496	0,130
4	250	0,0651

Substrat B

Secondes	Poises
63	0,00448
79	0,00562
96	0,00683

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	14	0,00364
5,5	12	0,00312
4	10	0,00260

Substrat B

Secondes	Poises
22	0,00156
35	0,00389
73	0,00518

Chromatographie :

R : les acides tri- et digalacturoniques en petite quantité.

B : peu d'acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 83 %.

La PME, adaptative, avec pH optimum de 5,5 s'interpose à nouveau dans l'action des deux autres enzymes produites : une endo-PG constitutive, avec pH optimum d'action à 4 et une endo-PMG constitutive aussi, mais agissant à pH 7,5.

Souche Vc5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	376	0,0977
5,5	612	0,159
4	583	0,151

Substrat B

Secondes	Poises
89	0,00632
136	0,00966
142	0,0101

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	17	0,00442
5,5	34	0,00884
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
33	0,00234
47	0,00334
90	0,00639

Chromatographie :

R et B : tracicules de polyuronides (acides tétra- et trigalacturoniques vraisemblablement).

PME : + + + + à pH 5,5,
+ faible à pH 7,5,
négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 80 %.

Ce germe donne 3 enzymes : une PME, très forte, qui annule l'action d'une endo-PG et d'une endo-PMG. Celles-ci apparaissent bien sur VF car elles sont constitutives et la PME adaptative ; il n'y a donc plus d'interaction sur ce milieu. La PME est active à pH 5,5, les 2 autres enzymes à pH 7,5.

Souche S5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0715
5,5	275	0,0715
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
35	0,00249
60	0,00426
122	0,00866

Culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : pas de tache visible.

B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques en faible quantité.

PME : négatif.

Pectine « B » digérée en 10 jours : 62 %.

La souche non active sur pectine déméthylée ou acide pectique ne l'est que sur pectine, elle ne sécrète qu'une endo-PMG adaptative avec activité optimum à pH 7,5 ; pas de PME.

Souche TF5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0715
5,5	275	0,0715
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
39	0,00277
90	0,00639
120	0,00852

Culture sur VF :

Pas de baisse de viscosité.

Chromatographie :

R : pas de tache.

B : tracicules d'acides tétra- et trigalacturoniques.

PME : négatif.

Pectine « B » digérée en 10 jours : 8 %.

Nous obtenons des résultats identiques à ceux du cas précédent : production d'une endo-PMG adaptative. Pourtant, il ne s'agit pas ici de la même espèce car les colonies sont totalement différentes.

Souche Fch7 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	36	0,00935
5,5	7,5	0,00194
4	6	0,00155

Substrat B

Secondes	Poises
19	0,00134
19	0,00134
29	0,00206

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	40	0,0105
5,5	60	0,0157
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
48	0,00342
53	0,00377
67	0,00477

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : mêmes résultats que R.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

 négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 75 %.

Trois enzymes sont sécrétées sur pectine : une endo-PG dont le pH optimum est de 4, une endo-PMG active à pH 7 et la PME classique des Champignons active dans les pH acides (pH 5).

Les enzymes semblent plutôt adaptatives, du moins la PME ; pour les deux autres enzymes, on observe des baisses de viscosité après culture sur VF mais celles-ci restent très faibles. De plus, il faut remarquer que la baisse de viscosité a lieu à pH 7 sur VF alors que l'endo-PG est active à pH 4.

Souche Scl7 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0716
5,5	8	0,00209
4	6	0,00157

Substrat B

Secondes	Poises
90	0,00640
37	0,00264
23	0,00164

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	33	0,00859
5,5	56	0,0146
4	275	0,0716

Substrat B

Secondes	Poises
78	0,00555
85	0,00604
110	0,00782

Chromatographie :

R et B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 70 %.

Nous avons d'abord une endo-PG active à pH 4 et une PME à pH optimum de 5,5. Il est à peu près certain que l'association de ces deux enzymes provoque une baisse de viscosité sur B ; celle-ci n'est pas due à une endo-PMG spécifique ; nous avons d'ailleurs remarqué que cette dernière était, la plupart du temps, active à pH 7,5 surtout (ici la baisse de viscosité a lieu à pH 4). Les deux enzymes sont adaptatives ; la baisse de viscosité que l'on observe sur R après culture sur VF est trop faible pour faire penser à une enzyme constitutive.

Souche Ld4 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	38	0,00989
5,5	26	0,00677
4	21	0,00547

Substrat B

Secondes	Poises
20	0,00143
20	0,00143
24	0,00171

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	12	0,00313
5,5	12	0,00313
4	12	0,00313

Substrat B

Secondes	Poises
31	0,00221
34	0,00242
54	0,00385

Chromatographie :

R : les acides tétra- et trigalacturoniques, en faible quantité.

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques plus abondants.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 84 %.

Production très nette de trois enzymes : l'endo-PG et l'endo-PMG sont constitutives. La première, active à pH 4 ; l'autre à pH 7,5 ; sur VF, le pH d'action semble mal défini. On peut affirmer l'existence de la PMG étant donné que la PME, adaptative, inactive à pH 7,5 n'interfère pas à ce niveau.

Souche GJ :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00208
5,5	6	0,00156
4	5	0,00130

Substrat B

Secondes	Poises
22	0,00156
22	0,00156
26	0,00185

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	17	0,00442
5,5	18	0,00468
4	21	0,00546

Substrat B

Secondes	Poises
41	0,00291
43	0,00305
65	0,00462

Chromatographie :

R : les acides di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

 négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 75 %.

Enzymes : endo-PG avec pH optimum à 4. Il ne s'agit sûrement pas d'une exo-PG : il y aurait beaucoup plus d'acide monogalacturonique que de digalacturonique. La dégradation est plus poussée car la solution contenait, sans doute, beaucoup d'enzymes. Il convenait d'arrêter la réaction avant 24 heures. Cette endo-PG est constitutive mais nous constatons, de nouveau, que la baisse de viscosité sur R avec le milieu VF a davantage lieu à pH 7,5 qu'à pH 4. L'endo-PMG semble adaptative, la baisse de viscosité étant peu importante. Elle est active à pH 7,5. La PME ne diffère pas de celle des autres souches.

Souche G.a.3 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	150	0,0390
5,5	6,5	0,00169
4	6	0,00156

Substrat B

Secondes	Poises
26	0,00185
28	0,00199
53	0,00376

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	6	0,00157
5,5	7	0,00183
4	45	0,0118

Substrat B

Secondes	Poises
87	0,00619
79	0,00562
50	0,00356

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

PME : + faible à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 65 %.

Sur pectine, le Champignon produit trois enzymes distinctes : une endo-PG active à pH 4, une endo-PMG active à pH 7,5 et une PME classique. Plus difficile est l'interprétation des résultats, lorsque ce Champignon est cultivé sur VF. Sur ce milieu, il donne certes une endo-PG mais active à pH 7,5, donc à l'inverse de celle produite sur pectine. Sans doute ne s'agit-il pas de la même enzyme ? Un phénomène identique se produit pour l'endo-PMG, quoique moins nettement.

Souche M4 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	60	0,0155
5,5	5,5	0,00142
4	5	0,00129

Substrat B

Secondes	Poises
72	0,00510
66	0,00468
44	0,00311

Culture sur VF :

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises		Secondes	Poises
7,5	18	0,00409		65	0,00462
5,5	18	0,00409		68	0,00484
4	19	0,00495		80	0,00569

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : pas de tache visible.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

 négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 76 %.

Production d'une endo-PG active surtout à pH 4, probablement constitutive bien que le pH d'action optimum soit inversé. Une PME classique des Champignons est sécrétée ; elle fait tomber la viscosité du substrat B à pH 5,5 et 4. Pas d'endo-PMG.

Souche Sp5V :

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises		Secondes	Poises
7,5	6	0,00155		19	0,00134
5,5	11	0,00285		21	0,00148
4	20	0,00519		29	0,00205

Culture sur VF :

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises		Secondes	Poises
7,5	8	0,00209		17	0,00121
5,5	9	0,00235		18	0,00129
4	17	0,00443		20	0,00143

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 58 %.

Enzymes : endo-PG et endo-PMG, actives à pH 7,5 et constitutives.

Pas de PME.

Souche VcL :

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises
7,5	8,5	0,00221
5,5	5	0,00130
4	5	0,00130

Secondes	Poises
16,5	0,00117
18	0,00129
21	0,00149

Culture sur VF :

Substrat R

Substrat B

pH	Secondes	Poises
7,5	11	0,00296
5,5	12	0,00312
5	13	0,00338

Secondes	Poises
25	0,00178
31	0,00221
48	0,00341

Chromatographie :

R : une seule grosse tache nette d'acide monogalacturonique.

B : les acides tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 77 %.

Les résultats de la chromatographie attestent que l'acide pectique est attaqué en bout de chaîne seulement. Il s'agit donc d'une exo-PG active à pH 4, sans doute constitutive (pH inversé). Une endo-PMG constitu-

tive, active à pH 7,5, ainsi qu'une PME classique sont également produites.

Souche SCl6 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	6	0,00156
5,5	7,5	0,00195
4	6	0,00156

Substrat B

Secondes	Poises
18	0,00128
20	0,00142
35	0,00249

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00260
5,5	25	0,00650
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
66	0,00469
75	0,00533
111	0,00788

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,
— à pH 7,5,
négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 83 %.

La dégradation de l'acide pectique (R) se fait aussi bien à pH 7,5 qu'à pH 4. Sur VF, cependant, l'activité PG n'a lieu qu'à pH 7,5 : ce qui expliquerait les résultats contradictoires de certaines souches étudiées précédemment. Ces Champignons produisent sans doute 2 endo-PG distinctes : l'une à pH d'action de 7,5 ; l'autre active à pH 4. Seule, l'endo-PG, active à pH 7,5, serait constitutive. L'endo-PMG toujours active à pH 7,5 est ici adaptative. La PME comme toujours est active à pH 5 et adaptative.

Souche Scl6 B :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00260
5,5	7,5	0,00195
4	6	0,00156

Substrat B

Secondes	Poises
19	0,00135
19,5	0,00138
33	0,00234

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	7	0,00182
5,5	15	0,00390
4	275	0,0715

Substrat B

Secondes	Poises
40	0,00284
47	0,00334
86	0,00611

Chromatographie :

R : les acides tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 75 %.

Il semble qu'il y ait cette fois encore production de 2 endo-PG différentes (pH 4 et pH 7,5) dont une seulement est constitutive. Une endo-PMG et une PME adaptatives sont sécrétées.

Souche TR3f :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	20	0,00519
5,5	14	0,00363
4	6	0,00155

Substrat B

Secondes	Poises
18	0,00128
18	0,00128
20	0,00142

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	10	0,00260
5,5	7	0,00182
4	6	0,00156

Substrat B

Secondes	Poises
50	0,00355
58	0,00412
72	0,00511

Chromatographie :

R : les acides tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 69 %.

Production d'une endo-PG, active à pH 4 et constitutive. L'endo-PMG et la PME sont adaptatives.

Souche Fch5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	12	0,00311
5,5	6	0,00155
4	5,5	0,00142

Substrat B

Secondes	Poises
17,5	0,00123
17,5	0,00123
31	0,00219

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00208
5,5	9	0,00234
4	10	0,00260

Substrat B

Secondes	Poises
17	0,00121
18	0,00128
30	0,00213

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 73 %.

Nous avons de nouveau l'impression d'avoir deux endo-PG : avec un pH optimum de 4 pour la première et de 7,5 pour la seconde. Elles sont constitutives. L'endo-PMG est aussi constitutive, action optimum à pH 7,5. La PME produite ressemble à celle des autres souches.

Souche S :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00207
5,5	14	0,00363
4	75	0,0194

Substrat B

Secondes	Poises
17	0,00119
18	0,00127
48	0,00340

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	8	0,00208
5,5	14	0,00364
4	25	0,00650

Substrat B

Secondes	Poises
18	0,00128
23	0,00163
60	0,00426

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : + faible à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 70 %.

Enzymes : endo-PG et endo-PMG, toutes les deux constitutives, avec pH optimum d'action à 7,5. Peu de PME classique.

Souche Sp5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	27	0,00742
5,5	20	0,00520
4	16	0,00416

Substrat B

Secondes	Poises
25	0,00178
34	0,00241
63	0,00447

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	9,5	0,00247
5,5	6,5	0,00169
4	5,5	0,00143

Substrat B

Secondes	Poises
77	0,00547
75	0,00533
70	0,00497

Chromatographie :

R : les acides tétra-, tri- et digalacturoniques en petite quantité.

B : Mêmes résultats.

PME : négatif.

Pectine digérée en 10 jours : 68 %.

Enzymes : une endo-PG constitutive, active à pH 4 ; une endo-PMG adaptative, active à pH 7,5 ; pas de PME.

Souche Ppl5 :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	200	0,0519
5,5	8	0,00207
4	6,5	0,00168

Substrat B

Secondes	Poises
21	0,00148
22	0,00155
27	0,00191

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0715
5,5	17	0,00442
4	9	0,00234

Substrat B

Secondes	Poises
45	0,00319
51	0,00362
67	0,00476

Chromatographie :

R : les acides tri-, di- et monogalacturoniques.

B : les acides tétra-, tri-, di- et monogalacturoniques.

PME : + à pH 5,5,

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 60 %.

L'endo-PG active surtout à pH 4 est constitutive ; l'endo-PMG, avec pH optimum d'action de 7,5 semble l'être également ; en effet, la baisse de viscosité de B à pH 7,5, après culture sur VF, n'est pas due à un résidu d'action de l'endo-PG puisque cette dernière est inactive à pH 7,5. PME classique, adaptative et active au-dessous de pH 5,5.

Souche Ppl :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	56	0,0147
5,5	7	0,00181
4	5	0,00129

Substrat B

Secondes	Poises
41	0,00290
36	0,00255
25	0,00177

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0715
5,5	25	0,00650
4	13	0,00338

Substrat B

Secondes	Poises
45	0,00319
55	0,00390
61	0,00433

Chromatographie :

R : acide monogalacturonique.

B : pas de tache visible.

PME : ++ à pH 5,5.

— à pH 7,5,

négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 75 %.

La chromatographie révèle que la pectine R est attaquée par une exo-PG constitutive et active à pH 4. Ce germe agit peu sur pectine proprement dite ; il est probable qu'il sécrète, en petite quantité, une endo-PMG, constitutive et active à pH 7,5. La baisse de viscosité que l'on observe sur B à pH 4 est due à l'action conjuguée de l'exo-PG et de la PME.

Souche Ppl5' :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	45	0,0118
5,5	5,5	0,00144
4	4,5	0,00118

Substrat B

Secondes	Poises
87	0,00619
62	0,00441
18,5	0,00132

Culture sur VF :

Substrat R

pH	Secondes	Poises
7,5	275	0,0716
5,5	25	0,00651
4	13	0,00339

Substrat B

Secondes	Poises
75	0,00534
77	0,00548
81	0,00576

Chromatographie :

R : acide monogalacturonique seul.

B : pas de tache visible.

PME : + à pH 5,5,
— à pH 7,5,
négatif sur VF.

Pectine digérée en 10 jours : 72 %.

Le germe produit, comme le précédent, une *exo-PG*, constitutive et active à pH 4. Il ne semble pas y avoir d'*endo-PMG* ; la forte baisse de viscosité, enregistrée sur B à pH 4 provient sans doute de l'action conjuguée de l'*exo-PG* et d'une PME en forte quantité. Cette dernière est adaptative et active au-dessous de pH 5,5.

CONCLUSIONS AU CHAPITRE VI

L'étude des 25 souches nous montre que les Champignons du sol attaquent la pectine d'une manière très variée, et souvent différente de celle des Bactéries et Actinomycètes. Dans l'ensemble cependant l'activité pectinolytique de ces souches et l'activité des souches des Champignons phytopathogènes, étudiées par d'autres auteurs, sont semblables. Parmi les Bactéries et les Actinomycètes, nous avons reconnu trois sortes d'enzymes pectinolytiques : une *endo-PG*, une *endo-PMG* et une PME, toutes les trois actives à pH 7,5. Avec les Champignons, il faut en ajouter trois autres : une *endo-PG* et une *exo-PG*, actives à pH 4, enfin une PME dont l'action maxima se situe aussi dans les pH acides (entre pH 4-5,5). La PME des Champignons diffère donc par son pH optimum de celle des autres microorganismes. Mais elle est toujours adaptative, comme chez les Bactéries et les Actinomycètes. C'est une enzyme fréquente chez les Champignons du sol puisque sur 25 souches étudiées 19 la détiennent. Les polygalacturonidases sont souvent constitutives ; seules, quelques souches ne sécrètent pas d'enzymes sur milieu VF. Parmi les PG les plus fréquentes, citons, tout d'abord, l'*endo-PMG* : 21 souches sur 25 en possèdent, elle est constitutive et active à pH 7,5. C'est donc la même que chez les autres germes. Deux souches (TF5, S5) ne produisent que cette unique enzyme. L'attaque des pectines déméthylées et de l'acide pectique se fait de trois façons :

1) Par une *endo-PG* active à pH 4 ; 13 souches sur 25 donnent cette enzyme qui peut être constitutive ou adaptative.

2) Par une *endo-PG* active à pH 7,5, enzyme que toutes les Bactéries et Actinomycètes libèrent. Parmi les Champignons, 10 souches sur 25 la produisent.

3) Par une exo-PG active à pH 4, assez rare semble-t-il puisque 3 souches seulement nous la montrent.

Huit souches étudiés (VC6, GJ, Ga3, M4, SCI6, SCI6B, Fch5, VCL) sont détentrices de deux enzymes du type PG, elles agissent en effet aussi bien à pH 4 qu'à pH 7,5, ce qui laisse supposer la présence d'une endo-PG à pH 4 et d'une endo-PG à pH 7,5.

Grâce à un système enzymatique de la pectinolyse, plus complet, les Champignons du sol sont à même d'attaquer des substrats beaucoup plus variés que les Bactéries ou les Actinomycètes. Ils sont très actifs et à leur place dans les sols acides tels que les mors forestiers et sur les feuilles acides, fraîchement tombées (feuilles de chênes). Sur ces substrats, les Champignons seuls peuvent digérer la pectine acide avec une endo-PG ou une exo-PG dont l'activité optimum est à pH 4. On dit souvent que les Champignons tolèrent plus l'acidité d'un milieu qu'ils ne la préfèrent. Ces expériences nous montrent que maintes souches ont une préférence bien marquée pour les substrats acides : 13 souches sécrètent des endo-PG actives seulement au-dessous de pH 5,5 et très actives à pH 4.

Le taux de digestion de la pectine après 10 jours de culture est relativement élevé. Il varie, évidemment, avec les différentes souches, ainsi 2 de celles-ci ne digèrent que 8-9 % de la pectine mise en œuvre. La moyenne pour les 25 est de 68 % digérés en 10 jours, moyenne plus élevée que celle des Actinomycètes pectinolytiques. Quelques souches dépassent les 80 %, ce résultat est toutefois encore bien en dessous du taux de digestion de certaines Bactéries anaérobies.

Après l'étude de l'ensemble des microorganismes, il nous a paru nécessaire de dresser un résumé sur les diverses sortes d'enzymes pectinolytiques produites. Nous adopterons, dans les grandes lignes, le plan de Demain et Phaff (28) mais nous serons obligé d'en modifier un peu le détail, pour tenir compte de nos résultats.

I. — SCISSION DES PONTS GLUCOSIDIQUES DE LA MOLÉCULE DE PECTINE.

A. — Scission au hasard de la molécule.

1) Pectine attaquée de préférence à l'acide pectique : *endo-polyméthylgalacturonidase* ou *endo-PMG*.

a) Hydrolyse partielle de pH 5,0 à 6,0 : *endo-PMG I* (*N. crassa*, *A. fœtidus*, *Cl. felsenium* var. *flavum*).

b) Hydrolyse partielle de pH 7 à 9 : *endo-PMG II* (Bactéries, Actinomycètes, Champignons).

2) Acide pectique ou pectine peu méthylée, attaqués de préférence à la pectine : *endo-polygalacturonidase* ou *endo-PG*.

a) Hydrolyse partielle à pH 4 : *endo-PG I* (Champignons).

b) Hydrolyse partielle de pH 7-8 : *endo-PG II* (Bactéries, Actinomycètes, Champignons).

B. — *Scission de la molécule en bout de chaîne.*

1) Pectine attaquée de préférence à l'acide pectique : *exo-polyméthylgalacturonidase* ou *exo-PMG* (pH d'action variable) (Champignons).

2) Acide pectique ou pectine peu méthylée, attaqués de préférence à la pectine : *exo-polygalacturonidase* ou *exo-PG* (action à pH 4) (Champignons).

II. — DÉMÉTHYLATION DE LA PECTINE : PECTINEESTÉRASE PE OU PECTINE-MÉTHYLESTÉRASE PME (deux termes synonymes).

a) Action de préférence de pH 4-5 : *pectineméthylestérase I* ou *PME I* (Champignons).

b) Action de préférence de pH 7 à 8 : *pectineméthylestérase II* ou *PME II* (Bactéries, Actinomycètes, plantes supérieures).

Demain et Phaff ne reconnaissent qu'une seule *endo-PG* active à pH 4 ; or, les expériences de Smith (151) et les nôtres montrent que les Bactéries et les Actinomycètes produisent une *endo-PG* active dans les pH voisins de la neutralité ; il convient donc de la distinguer de la première. Le même fait se renouvelle pour les *PME*. Quant à l'*endo-PMG*, la situation est plus confuse. Demain et Phaff en citent deux : une active de pH 5,0 à 6,0, produite par quelques Champignons, l'autre active de pH 8 à 9 se rencontrant surtout parmi les *Erwinia*. L'examen de nos souches ne nous a fourni qu'une seule *endo-PMG*, avec pH optimum de 7 à 8. Une seule souche : *Cl. felsineum* var. *flavum* (Dax) avait un pH optimum d'action à 5,5. Ceci nous a incité à

conserver les deux divisions de Demain et Phaff. Les exoenzymes (exo-PG, exo-PMG) sont moins bien connues, surtout l'exo-PMG qui n'a été isolée que d'une façon discutable. L'exo-PG, active à pH 4, existe certainement, elle reste l'apanage presque exclusif des Champignons.

Nous sommes maintenant à même de comprendre pourquoi le système préconisé par Schubert (147) en 1954 n'est plus valable. Sa γ -pectine-glycosidase est, selon l'auteur, active et sur pectine et sur acide pectique. Nos expériences prouvent cependant que beaucoup de germes n'attaquent que l'acide pectique ou seulement la pectine : conclusion nettement en faveur de deux enzymes distinctes : d'autres expériences d'auteurs (28) (Demain, Phaff) employant des enzymes purifiées confirment nos dires. Schubert ne s'occupe pas non plus de savoir si la pectine est attaquée au hasard de la molécule ou en bout de chaîne. Comme nous l'avons déjà vu dans l'historique, le système très récent de Deuel et Stutz (29) est trop succinct. Sa simplicité repose sur le fait qu'il ne tient absolument pas compte des pH optimum d'action des enzymes.

Le catabolisme de la pectine aboutit d'abord à la production d'acides polygalacturoniques et, plus spécialement, d'acides penta-, tétra-, tri- et digalacturoniques, lorsqu'il s'agit d'endoenzymes. Ces uronides peuvent être plus ou moins estérifiés si le germe, tout en s'attaquant à des pectines, ne possède pas de PME. Ceci se traduit sur le chromatogramme par des traînées de polyuronides. Les taches sont bien distinctes quand ceux-ci sont complètement déméthylés.

Comme Luh et Phaff (90) l'ont démontré sur les levures, la dépolymérisation des acides penta- à digalacturoniques se fait avec la même enzyme qui a attaqué la pectine, mais plus lentement. Dans un premier temps rapide, l'endo-PG ou PMG dépolymérise l'acide pectique ou la pectine, en polyuronides solubles. Ce n'est que dans une seconde période beaucoup plus lente, que ceux-ci sont à leur tour transformés en acides di- et monogalacturoniques. Ainsi, si on maintient trop la solution enzymatique au contact du substrat, on n'a plus sur le chromatogramme que deux grosses taches d'acides di- et monogalacturoniques qui pourraient à la rigueur faire penser à des exoenzymes. Mais, en laissant incuber moins longtemps, on retrouve les acides tétra- à di-galacturoniques. Certains auteurs pensent, non sans raisons, que pour certaines espèces, deux enzymes distinctes existent afin d'accomplir ces deux phases ; pendant longtemps, on a parlé de dépolymérase sans en avoir démontré clairement la présence. Toutefois, l'auteur japonais Kaji (70) a récemment purifié deux enzymes chez une variété de *Clostridium felsineum* : l'une est une dépolymérase qui coupe la molécule de pectine en tronçons de quelques maillons. Les tronçons sont repris par une exo-PG qui les décompose jusqu'au stade de l'acide galacturonique. Cette

dernière enzyme ne peut s'attaquer directement à la pectine alors que l'exo-PG, classiquement décrite, s'attaque d'emblée à l'acide pectique dont elle retranche l'acide galacturonique maillon par maillon.

Quelle que soit l'enzyme qui intervienne, c'est toujours l'acide galacturonique ou son ester méthylique qui constituent l'ultime phase de la dégradation de la pectine par les polygalacturonidases, principales enzymes de la pectinolyse.

CINQUIÈME PARTIE

MÉTABOLISME
DE L'ACIDE GALACTURONIQUE

La scission des ponts glucosidiques de la molécule de pectine aboutit, en fin de compte, à la libération d'acide monogalacturonique qui détermine la structure des substances pectiques. Cet acide sera repris par les microorganismes pectinolytiques, lesquels, à l'aide de plusieurs enzymes, le feront retourner dans les différents cycles ternaires. Les différentes voies du catabolisme de l'acide galacturonique sont encore peu étudiées. Kilgore et Starr (78) ont principalement approfondi ce problème. Ils ont montré que *E. carotovora* de même que *S. marcescens*, *A. aerogenes* et *E. coli* possèdent deux enzymes principales : une *acide uronique-isomérase* et une *acide céturnique-réductase*. L'acide galacturonique est finalement transformé grâce à elles, en acide pyruvique et en triose-phosphate, rattachant ainsi le cycle de l'acide galacturonique au cycle glycolytique, au niveau du triose. *Ps. synringæ* (Kilgore, Starr (77)) procède tout autrement avec une seule enzyme : une *acide uronique-déshydrogénase*. Nos connaissances sur ce problème capital s'arrêtent là ; et il appartient aux biochimistes d'étendre ces recherches aux divers groupes de microorganismes pectinolytiques. Les Bactéries sporulées, asporulées, anaérobies, les Myxobactéries, les Actinomycètes et les Champignons possèdent, sans doute, chacun leur système propre pour tirer de l'acide galacturonique le maximum d'énergie.

Mais, avant de connaître le mécanisme intime de ce catabolisme, il est nécessaire de savoir quels sont les microorganismes capables de métaboliser ces substances. Il paraît évident que tout microorganisme pectinolytique doit pouvoir attaquer l'acide galacturonique. Cette question a déjà intéressé maints auteurs et, en particulier, l'École française avec M. Raynaud (143) et A.-R. Prévot (129) ; ils ont démontré que les pectinolytiques anaérobies véritables digèrent 100 % du galacturonate mis en œuvre, alors que les pectinolytiques douteux, mais semi-rouisseurs, comme *Cl. corallinum*, *saturnirubrum*, *roseum*, *haumannii* ne fermentent pas ou très peu cet acide.

L'attaque de l'acide galacturonique est donc assuré avant tout par les pectinolytiques eux-mêmes. Toutefois, il ressort de certains travaux que des germes non pectinolytiques métabolisent aisément les acides uroniques. Payne et MacRorie (115) ont ainsi prouvé que *Serratia marcescens*, germe non pectinolytique, catabolise l'acide galacturonique de la même manière que *E. carotovora*.

Tous les microorganismes pectinolytiques peuvent attaquer l'acide galacturonique mais tous les germes métabolisant l'acide galacturonique ne sont pas forcément des pectinolytiques. Telle semble être la loi que

nous pouvons tirer de ces quelques constatations. Pour la vérifier, nous avons mesuré l'attaque de l'acide galacturonique par toutes nos souches de pectinolytiques.

Le métabolisme de l'acide galacturonique dans le sol a fait l'objet d'une étude quantitative sur les Bactéries aérobies. Les terres françaises qui ont servi pour la recherche des pectinolytiques ont été reprises à cet effet.

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE QUANTITATIVE DE L'ACTIVITÉ GALACTURONIDASIQUE DANS DIFFÉRENTES TERRES FRANÇAISES

MILIEU DE CULTURE

Solution de Winogradsky	50 cm ³
Extrait de terre	50 »
Eau distillée	900 »
Nitrate d'ammonium	2 g
Acide D ⁺ -galacturonique (*)	5 »
Lessive de soude pure	2,5 cm ³ environ (pour ajuster le milieu à pH 7,5).

Ce milieu liquide est réparti en tube de 22 mm, à raison de 5 cm³.

Stérilisation 1/2 heure à 110° C.

Pour les Bactéries anaérobies, on peut employer le milieu suivant :

Eau distillée	1 000 cm ³
Peptone	5 g
Extrait de levure (Difco, Byla)	5 »
Acide D ⁺ -galacturonique (*)	5 »
Lessive de soude pour neutraliser	3 cm ³ (environ)

Répartition à raison de 6 cm³ en tubes de 14 mm, stérilisation : 1/2 heure à 110° C.

On prépare comme à l'ordinaire des suspensions-dilution de terres de 10 en 10, en eau distillée et on ensemence 0,5 à 1 cm³ de dilution par tube (3-5 tubes par dilution).

(*) Acide D⁺-galacturonique en poudre Roche.

SOLS BRUNS CALCAIRES (B)

B₂

Dil.	G		T	
10 ²	+	+	+	+
10 ³		»		»
10 ⁴		»		»
10 ⁵	+	+	—	»
10 ⁶	+	+	—	»
10 ⁷	+	+	—	»
10 ⁸	+	—	+	—
N. A.	700 000		120 000 000	
Rapport	1 : 171			

B₃

G		T	
+	+	+	+
»	»	»	»
»	»	»	»
—	—	—	»
+	—	—	»
—	—	—	»
—	—	—	+
—	—	—	—
70 000		120 000 000	
1 : 1 714			

(1 : 460)

B₄

Dil.	G		T	
10 ²	+	+	+	+
10 ³		»		»
10 ⁴		»		»
10 ⁵	+	+	—	»
10 ⁶	+	+	—	»
10 ⁷	—	—	—	»
10 ⁸	—	—	+	+
N. A.	190 000		230 000 000	
Rapport	1 : 1 210			

(1 : 309)

B₅

G		T	
+	+	+	+
»	»	»	»
»	»	»	»
+	+	—	»
+	+	—	»
—	—	—	»
—	—	—	—
600 000		50 000 000	
1 : 83			

(1 : 5 000)
?

B₆

G		T	
+	+	+	+
»	»	»	»
»	»	»	»
+	—	—	»
+	—	—	»
+	—	—	»
—	—	—	—
260 000		50 000 000	
1 : 192			

(1 : 3 000)
?

SOLS DE GRANDES CULTURES (C)

C1

Dil.	G		T	
10 ⁻²	+	+	+	+
10 ⁻³			»	
10 ⁻⁴			»	
10 ⁻⁵	+	+	»	
10 ⁻⁶	+	+	»	
10 ⁻⁷	+	+	»	
10 ⁻⁸	—	—	—	—
N. A.	330 000		50 000 000	
Rapport	1 : 151			

(1 : 566)

C4

Dil.	G		T	
10 ⁻²	+	+	+	+
10 ⁻³			»	
10 ⁻⁴			»	
10 ⁻⁵			»	
10 ⁻⁶	—	—	»	
10 ⁻⁷			+	+
10 ⁻⁸			—	—
N. A.	500 000		12 000 000	
Rapport	1 : 24			

(1 : 195)

C2

G		T	
+	+	+	+
	»	»	
+	+	»	
+	+	»	
+	—	»	
+	—	»	
—	—	+	+
			—
	320 000	120 000 000	
	1 : 375		

(1 : 3 100)

C5

G		T	
+	+	+	+
	»	»	
	»	»	
	»	»	
—	—	»	
—	—	»	
—	—	—	—
	500 000	50 000 000	
	1 : 100		

(1 : 117)

C3

G		T	
+	+	+	+
	»	»	
	»	»	
+	+	—	
—	—	—	
+	—	—	+
—	—	—	—
	330 000	23 000 000	
	1 : 69		

(1 : 260)

C6

G		T	
+	+	+	+
	»	»	
	»	»	
	»	»	
+	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
	700 000	5 000 000	
	1 : 7		

(1 : 154)

SOLS PODZOLISÉS ACIDES (D)

D1

Dil.	G	T
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	»	»
10 ⁻⁵	»	»
10 ⁻⁶	—	—
10 ⁻⁷	»	»
10 ⁻⁸	»	—
N. A.	50 000	12 000 000
Rapport	1 : 240	

(1 : 82)

D2

G	T
+	+
»	»
»	»
+	—
—	—
»	»
»	—
120 000	5 000 000
1 : 41	

(1 : 250)

D3

G	T
+	+
»	»
»	»
+	—
—	—
»	»
»	—
70 000	7 000 000
1 : 100	

(1 : 200 ?)

D4

Dil.	G	T
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	»
10 ⁻⁴	+	»
10 ⁻⁵	+	»
10 ⁻⁶	—	—
10 ⁻⁷	»	—
10 ⁻⁸	»	»
N. A.	23 000	700 000
Rapport	1 : 30	

(1 : 208)

D6

G	T
+	+
»	»
»	»
»	»
+	—
—	—
»	»
2 300 000	50 000 000
1 : 21	

(1 : 100)

Boues (D, E)

D₇

Litière n° 4

Dil.	G	T
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	»	»
10 ⁻⁵	»	»
10 ⁻⁶	»	»
10 ⁻⁷	+	+
10 ⁻⁸	—	—
N. A.	2 300 000	50 000 000
Rapport	1 : 21	

(1 : 1 500)

E₃

Dil.	G	T
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	»	»
10 ⁻⁵	»	»
10 ⁻⁶	—	—
10 ⁻⁷	—	—
10 ⁻⁸	»	»
N. A.	70 000	12 000 000
Rapport	1 : 171	

(1 : 210)

E₂

G	T
+	+
»	»
»	»
»	»
+	—
—	—
—	—
—	—
700 000	50 000 000
1 : 71	

(1 : 204)

E₅

G	T
+	+
»	»
»	»
»	»
+	—
—	—
—	—
—	—
120 000	1 900 000
1 : 16	

(1 : 270)

Après 10 jours de cultures à 28° C, nous avons ajouté à chaque tube le réactif d'Ehrlich (3g) qui, en présence d'acide galacturonique et après ébullition, donne un précipité rouge brique. Lorsque l'acide galacturonique est complètement digéré, il se forme un précipité blanc léger. Si l'attaque n'est que partielle, le précipité rouge brique est moins abondant que dans un tube témoin non cultivé.

RÉACTIF D'EHRlich

On prépare une solution saturée d'acétate de plomb basique (5 g pour 100 cm³ d'eau distillée). Chaque tube de culture reçoit 3 cm³ de réactif, il se forme un précipité blanc d'aspect variable ; on mélange bien et on porte le tube au bain-marie bouillant pendant 5 minutes. Un précipité rouge brique apparaît en présence d'acide galacturonique.

L'étude suivante porte sur les Bactéries aérobies métabolisant le galacturonate dans le sol (G). Nous avons comparé leur nombre au nombre total des Bactéries aérobies du sol (T) (culture sur extrait de terre liquide). Entre parenthèses figure le nombre des Bactéries pectinolytiques aérobies par rapport au total des germes (pour la description des différentes terres, se reporter au chapitre premier de la II^e partie de la thèse).

CONCLUSIONS AU CHAPITRE I

La technique employée pour ces numérations donne des résultats réguliers. L'attaque est toujours complète dans les faibles dilutions et diminue avec les dilutions plus poussées. Ce milieu liquide ne peut convenir qu'aux Bactéries car les Champignons et Actinomycètes sont inhibés par la croissance abondante et beaucoup plus rapide des Bactéries.

Les Bactéries galacturonidasiques réagissent, dans l'ensemble, comme les Bactéries pectinolytiques. Abondantes dans les sols riches de jardins, par exemple, elles sont peu nombreuses dans les sols acides ou peu fertiles. Dans les terres de jardins et le terreau L6, nous en trouvons de 1 à 5 millions par gramme de terre ; la terre A4 fait exception avec 190 000 germes, mais cela s'explique facilement à cause du pH trop alcalin du sol (9).

Les sols bruns calcaires en contiennent un nombre moyen de

70 000 à 700 000. Les chiffres sont à peu près semblables pour les sols lourds de grandes cultures (C) : de 300 000 à 700 000 par gramme de sol. Les sols acides podzolisés ne sont évidemment guère favorables à ces germes, pas plus qu'aux autres Bactéries. Le maximum trouvé pour ces terres est de : 120 000, le minimum : 23 000. Il ne faut pas tenir compte de la terre D6 qui, par son pH de 6,2 et sa grande teneur en eau, se rattache déjà aux boues neutres. Cette terre ainsi que la terre D7 et la litière n° 4 contiennent un nombre de ces Bactéries égal à celui des terres de jardins. La litière n° 4 possède même 12 millions de ces germes. La forte teneur en eau et l'abondance de matières organiques sont les deux facteurs communs à ces trois échantillons ; leur réunion semble donc favorable à la multiplication de ces microorganismes. Le pH ne semble pas intervenir puisque la terre D7, avec un pH de 4,8, en détient encore 2,3 millions. Les autres boues nous donnent des teneurs fort variables mais toujours moyennes, en Bactéries galacturonidasiques (70 000-700 000). La boue E3, à odeur de SH_2 , semble particulièrement défavorisée ; sans doute est-ce dû à la grande quantité de SH_2 qui est toxique pour de nombreux microorganismes.

Il est difficile de comparer le nombre de ces germes à celui des Bactéries pectinolytiques, car la technique de numération est toute différente. On peut cependant essayer de confronter les rapports de ces deux groupes vis-à-vis de l'ensemble des microorganismes. Pour faciliter la tâche, nous avons placé au-dessous du rapport $\frac{\text{Bactéries galacturonidasiques}}{\text{Total des Bactéries}}$

$$\left(\frac{G}{T}\right) \text{ le rapport } \frac{\text{Bactéries pectinolytiques}}{\text{Total des Bactéries}} \left(\frac{P}{T}\right).$$

Le rapport $\frac{G}{T}$ comme le rapport $\frac{P}{T}$ sont extrêmement variables mais, dans plusieurs cas, $\frac{G}{T}$ est plus élevé que $\frac{P}{T}$, cela veut dire que le nombre de Bactéries galacturonidasiques est plus élevé que le nombre de pectinolytiques, ou bien que de nombreuses Bactéries, métabolisant le galacturonate, ne sont pas en même temps pectinolytiques. C'est tout à fait vraisemblable lorsque $\frac{G}{T}$ est beaucoup plus élevé que $\frac{P}{T}$. Exemple : la terre D7, où nous trouvons une Bactérie galacturonidasique pour 25 autres germes, contre une Bactérie pectinolytique pour 1 500 Bactéries. Dans les terres où la différence entre les deux rapports est moins grande, il peut bien entendu s'agir d'un écart dû aux techniques très diverses. C'est certainement ce qui se passe dans 4 terres où $\frac{G}{T}$ est plus faible que $\frac{P}{T}$; cela signifierait que toutes les Bactéries pectinolytiques

ne métabolisent pas l'acide galacturonique. Nous verrons, dans le chapitre suivant, qu'en fait quelques pectinolytiques aérobies n'attaquent pas le galacturonate.

Quoi qu'il en soit, les Bactéries galacturonidasiques se trouvent dans toutes les terres en nombre suffisant et souvent important pour métaboliser rapidement et complètement l'acide galacturonique libéré par la pectinolyse.

CHAPITRE II

ATTAQUE DE L'ACIDE GALACTURONIQUE PAR LES BACTÉRIES PECTINOLYTIQUES DU SOL

Différentes techniques peuvent servir pour doser l'acide galacturonique résiduel après la culture de microorganismes, sur des milieux à base de galacturonate de Na. La mesure de l'acidité produite soit à l'aide d'indicateurs, soit par titrimétrie n'est valable que pour les Bactéries anaérobies qui, en général, acidifient le milieu après digestion du galacturonate. Cette technique toutefois ne saurait servir pour les microorganismes aérobies qui, pour la plupart, attaquent le galacturonate, sans abaisser le pH du milieu de culture. D'ailleurs, l'acidité produite ne renseigne pas sur la quantité d'acide galacturonique fermenté. Pour des mesures quantitatives, deux techniques sont valables : celle de Somogyi (153) qui dose l'acide galacturonique résiduel grâce à son pouvoir réducteur, et celle qui utilise le réactif d'Ehrlich (39). Nous avons employé cette dernière.

Les souches de microorganismes pectinolytiques aérobies sont cultivées sur le milieu décrit au Chapitre premier mais additionné de 3 g % d'extrait de levure. Les souches anaérobies sont repiquées sur le milieu au galacturonate mentionné plus haut. Après 10 jours, on centrifuge les cultures afin d'éliminer les corps microbiens. A 5 cm³ de liquide de culture, on ajoute 3 cm³ de réactif d'Ehrlich. Le précipité rouge obtenu après chauffage au bain-marie bouillant est recueilli par centrifugation, desséché et pesé. On compare à un témoin non ensemencé et on exprime en pourcentage le taux de galacturonate digéré. L'absence de précipité rouge indique une digestion à 100 %.

Toutes nos souches de microorganismes pectinolytiques ont été examinées. Pour chaque espèce, le taux de digestion du galacturonate est reporté après 10 jours de culture (entre parenthèses, le taux de digestion de la pectine dans le temps correspondant).

Bactéries asporulées.

	%	%
<i>Pseudomonas sauromali</i>	48	(42)
<i>Ps. schuyllkilliensis</i>	68	(69)
<i>Ps. fairmountensis</i>	72	(60)
<i>Ps. boreopolis</i>	72	(63)
<i>Ps. putida</i>	92	(61)
<i>Empedobacter pectinovorum</i>	78	(85)
<i>E. aquatile</i>	76	(73)
<i>E. dormitator</i>	76	(79)
<i>E. balustinum</i>	67	(très peu)
<i>E. exile</i> 16/49	32	(54)
<i>E. viride</i> (RsK5)	20	(46)
<i>E. radicum</i>	0-20	(44)
suivant les souches		
<i>E. radicum</i> var. <i>ruwenzori</i>	84	(60)
<i>E. arundineti</i>	52	(68)
<i>E. esteroaromaticum</i> var. <i>viscosa</i> ...	56	(66)
<i>Xanthomonas vascularum</i> var. <i>palustris</i>	8	(63)
<i>Erwinia betivora</i>	90	(63)
<i>Achromobacter sewerini</i>	35	(très peu)
<i>Achr. mariense</i>	13	(51)
<i>Achr. venenosum</i>	39	(?)
<i>Acinetobacter metalcaligenes</i>	0	(?)
<i>Acinetobacter butyri</i> 12/14	12	(51)
» G.a.	0	(20)
<i>Vibrio piger</i>	0	(19)

Bactéries sporulées.

<i>Bacillus subtilis</i>	88	(56)
<i>Bacillus salpæ</i>	36	(76)
<i>Bacillus pumilus</i>	0	(57)
<i>Bacteridium capillosum</i>	0	(9,5)
<i>Endosporus circulans</i>	0-72	(72)
suivant les souches		
<i>E. humi</i>	0-57	(70)
suivant les souches		
<i>E. multiplex</i>	0-77	(73)
suivant les souches		

	%	%
	—	—
<i>E. praeus</i>	8	(9,5)
<i>Clostridium polymyxa</i>	76-100	(61-100)
	suivant	suivant
	le milieu	le milieu
<i>Cl. pectinolyticum</i>	100	(55-100)
<i>Cl. grave</i>	100	(72)
<i>Cl. omnivorum</i>	100	(72)
<i>Cl. laniganii</i>	100	(60-92)
<i>Cl. eruptens</i>	100	(83)
<i>Cl. aurantibutyricum</i>	100	(100)
<i>Cl. felsineum</i> var. <i>flavum</i>	100	(95)
<i>Cl. opertum</i>	100	(90)
<i>Terminosporus sphæricus</i>	0	(très peu)
<i>Plectridium pectinovorum</i>	83-100	(66)
	suivant les souches	
<i>Cl. pectinovorum</i> var. <i>butyricum</i>		
PJ	100	(50)
<i>Pl. virens</i>	71	(56)
<i>Angiococcus disciformis</i>	92	(100)

L'attaque de l'acide galacturonique est irrégulière chez les Actinomycètes : certaines souches le fermentent et d'autres pas. La fermentation du galacturonate est plus régulière chez les Champignons étudiés qui, sauf de rares exceptions, l'attaquent tous.

CONCLUSIONS AU CHAPITRE II

L'activité galacturonidasique est très différente d'une Bactérie à l'autre. L'activité maxima se trouve surtout parmi les anaérobies qui, presque tous, fermentent complètement l'acide mis en œuvre. Chez les aérobies, seuls, quelques germes approchent des 100 % de digestion : ce sont : *E. betivora*, *B. subtilis*, ainsi que *Ps. putida*. Les autres espèces se comportent de diverses manières. Tous les degrés d'activité sont représentés en commençant par les souches sans pouvoir galacturonidasique. Parmi celles-ci nous avons *Empedobacter radicum*, *Acinetobacter metalcaligenes* et *butyri*, *Vibrio piger*, *Bacillus pumilus*, *Bacteridium capillosum*, des souches d'*Endosporus circulans*, d'*E. humi*

et d'*E. multiplex*, *Terminosporus sphaericus*, *X. vascularum* var. *palustris* et *Endosporus pravus* peuvent aussi être considérés comme pratiquement inactifs.

Comparons maintenant l'activité galacturonidasique à l'activité pectinolytique, pour une souche donnée. On aurait pu penser, logiquement, qu'étant un composé plus simple, le galacturonate serait davantage métabolisé que la pectine. Mais un bilan sommaire des résultats nous montre que, pour 15 espèces, la fermentation du galacturonate est supérieure à celle de la pectine ; pour 14 elle est à peu près égale et, pour 17 autres, le catabolisme de l'acide galacturonique est nettement inférieur à celui de la pectine. L'activité galacturonidasique n'est donc pas forcément proportionnelle à la pectinolyse.

Ces données prouvent que les enzymes du métabolisme du galacturonate sont très différentes de celles de la pectinolyse. Kraght et Starr (78) l'avaient déjà démontré en isolant chez *E. carotovora* les enzymes responsables de l'activité galacturonidasique qui n'ont aucun pouvoir sur la pectine.

Quelques Bactéries pectinolytiques citées plus haut n'attaquent pas du tout le galacturonate. Quel avantage ces germes tirent-ils donc de la pectinolyse ? On peut avancer l'hypothèse, selon laquelle le germe en question tire une certaine énergie du fait même de la scission de la macromolécule de pectine en tronçons plus petits ; il s'agirait donc d'une réaction exergonique.

En résumé, nous dirons que l'attaque de la pectine est indépendante de l'attaque de l'acide galacturonique puisque ce sont deux systèmes enzymatiques différents. Un grand nombre de pectinolytiques détient les deux systèmes d'enzymes et tire, de ce fait, le maximum d'énergie de la pectinolyse car celle-ci peut ainsi être conduite jusqu'au stade final. Quelques pectinolytiques ne possèdent pas le système d'enzymes permettant le catabolisme du galacturonate ; dans ce cas, le rendement énergétique doit être assez faible. Enfin, certains germes n'ont que les enzymes galacturonidasiques.

SIXIÈME PARTIE

DISCUSSION.

RELATIONS ENTRE PLANTES
ET MICROORGANISMES PECTINOLYTIQUES

La destruction de la pectine dans la nature met en jeu deux protagonistes : d'une part, la plante, d'autre part, le microbe et c'est de la nature de l'un et de l'autre que dépendra l'allure de la pectinolyse.

Du vivant de la plante, le problème de la pectinolyse intéresse plus particulièrement le phytopathologiste. On peut se demander pourquoi les pectinolytiques ne sont pas tous phytopathogènes. Lapwood (85) qui a comparé l'activité pectinolytique d'*Erwinia aroideæ*, des *Flavobacterium* et des *Pseudomonas* pectinolytiques du sol, trouve que *E. aroideæ* sécrète ses enzymes en plus forte quantité et plus rapidement que les autres germes, si bien que la plante blessée n'a pas le temps de s'opposer à l'attaque du germe par la formation d'une nouvelle barrière protectrice. Depuis lors, d'autres auteurs (29) ont montré que *E. aroideæ* possédait non seulement des enzymes pectinolytiques en grande quantité, mais aussi un facteur toxique qui tue les cellules. Ceci expliquerait pourquoi des *Pseudomonas* banaux, tirés de végétaux atteints d'une pourriture molle, ne peuvent pas, une fois isolés, reconstituer la maladie, ils y arrivent lorsqu'ils sont associés avec les autres germes présents qui possèdent, sans doute, le facteur létal. D'après Lepoutre (87) et des travaux anciens, des pectinolytiques banaux et parmi eux des *Pseudomonas* peuvent devenir phytopathogènes après passages successifs sur des fragments de tissus végétaux vivants. Pour Paton (113) d'ailleurs, certaines nécroses sont souvent dues à des *Pseudomonas* pectinolytiques. *Clostridium polymyxa* a été quelquefois trouvé à l'origine de lésions diverses. Volcani et Dowson (173) l'ont isolé d'une lésion noirâtre de *Capsicum annuum*. C'est pourtant un pectinolytique banal des sols, avec lequel nous n'avons pu obtenir la pourriture de la pomme de terre, dans des circonstances normales.

La relation entre pouvoir pathogène et pectinolyse est donc assez complexe. Il semble, en tout cas, qu'il ne suffit pas à un germe d'être pectinolytique pour pouvoir attaquer une plante saine. Le problème prend un aspect très varié suivant la résistance de la plante (on pourrait dire suivant le terrain de celle-ci). Rappelons que pour isoler du sol des Bactéries phytopathogènes pectinolytiques, Kerr (74) a mis au point une méthode ingénieuse ; elle est basée sur le fait que celles-ci pénètrent à l'intérieur de la pomme de terre par les lenticelles, alors que les pectinolytiques banaux en sont incapables. Mais ces tubercules sont placés dans des conditions très défavorables puisque submergés sous une couche d'eau ; ce qui n'est pas souvent le cas dans la nature. Nous n'approfondirons pas davantage ces questions dont Wood (187) vient de publier une étude détaillée.

Un deuxième aspect de la relation entre plante vivante et microbe

pectinolytique est celui de la rhizosphère. Nous avons vu que les différentes plantes possédaient, autour de leurs racines, une quantité considérable de microbes pectinolytiques, variables suivant la plante en question, et que certains groupes de pectinolytiques, certains *Empedobacter* plus spécialement, étaient davantage stimulés que les autres microorganismes. Il est très difficile de savoir, au point de vue pectinolyse, quel est le rôle exact de ces germes. Il est possible qu'ils n'exercent pas leur pouvoir pectinolytique autour de la plante ou que ce pouvoir soit sans importance sur celle-ci. D'autres échanges, qui n'ont rien à voir avec la pectinolyse, ont certainement lieu entre ces germes et la plante puisque nous sommes en présence de polyphages non spécialisés. Mais des expériences ont montré que quelques espèces produisaient des enzymes pectinolytiques au contact des racines, en culture hydroponique. En est-il de même dans la nature et si oui, quel est le rôle de ces enzymes sur la plante vivante ? Pour Roudakoff et Birkel (82), l'action des Bactéries pectinolytiques sur le système racinaire du trèfle permet l'augmentation des rhizomes et la formation de structures solides du sol. On peut envisager aussi que la sécrétion continue d'enzymes pectinolytiques, à la surface des racines, oblige ces dernières à renforcer constamment leur paroi pour parer à cette attaque chronique. Mais, c'est à la mort de la plante, que le rôle des pectinolytiques rhizosphériques devient plus évident. A ce moment, la plante n'offre plus de résistance et les enzymes pectinolytiques ramollissent les tissus radiculaires. La foule de microorganismes et, en premier lieu, les pectinolytiques vont pénétrer à l'intérieur de la plante, démolissant les tissus organisés qui retournent à l'état minéralisé.

La digestion de la pectine dans la plante morte ou vivante dépendra de la configuration du tissu, de la qualité de la pectine et, finalement, du ou des germes pectinolytiques.

La résistance de la plante ou d'un organe de celle-ci est surtout déterminée par ses tissus de soutien. La lignine, la cellulose, les hémicelluloses et la pectine sont les 4 composés principaux qui forment ces tissus. La pectine est la plus facile à détruire, et ceci pour 3 raisons principales :

1) Ainsi que nous l'avons dit dans notre rappel physicochimique, la pectine est fragile et vite dépolymérisée par une foule d'agents physicochimiques : acides, alcalis, oxygène, chaleur, rayons, etc. ; les 3 premiers composés nommés se stérilisent aisément par la chaleur, tandis qu'il faut prendre de grandes précautions pour détruire la pectine le moins possible.

2) Plus que les autres composés, la pectine a tendance à absorber de l'eau ; elle gonfle à l'humidité et peut former des gels, donc des

substrats solides, contenant 99 % et plus d'eau. Cette quantité d'eau considérable favorise l'attaque par les microorganismes qui se développent mieux dans un milieu aqueux.

3) Enfin, l'attaque de la pectine ne nécessite pas des microorganismes spécialisés mais des polyphages banaux très répandus dans la nature et se multipliant aisément sur des substrats multiples.

Du fait de la plus grande fragilité de la pectine, il découle que, plus un tissu végétal contient cette substance au détriment des autres grands groupes, plus le tissu sera la proie facile des microorganismes. La résistance d'une plante à la destruction microbienne est donc, en quelque sorte, inversement proportionnelle à la quantité de pectine qu'elle contient. Dans le même sens, on pourra dire que plus le pourcentage de matériaux résistants (lignine, cellulose, etc.) s'accroît, plus la pectine sera difficilement attaquable au sein de ce tissu.

Dans un bois dur, par exemple, où la proportion de pectine n'atteint que 0,5 %, le problème de la pectinolyse est aussi mécanique ; le tissu lignifié, rigide et dense, s'opposera à la pénétration des microorganismes. Seuls, quelques Champignons spécialisés possédant les enzymes de la ligninolyse peuvent s'introduire dans ce bois. Ils laisseront pénétrer à leur suite d'autres germes pectinolytiques ou digéreront souvent la pectine eux-mêmes, s'ils possèdent à la fois les enzymes pectinolytiques et ligninolytiques. Ces Champignons polyvalents habitant le bois ne sont pas rares. Lyr (91) a isolé, en effet, 8 espèces de Champignons supérieurs (Basidiomycètes) qui attaquent le bois et digèrent la pectine. D'ailleurs, les Champignons ont la supériorité sur les Bactéries de pénétrer à l'intérieur du substrat, non seulement par voie enzymatique chimique, mais par voie mécanique, car les hyphes s'insinuent entre les cellules et disloquent les tissus. A cet avantage, il faut ajouter celui d'un équipement enzymatique de la pectinolyse souvent plus complet chez les Champignons que chez les Bactéries. Toutefois, il est certain que les Champignons pectinolytiques ne sont pas seuls à digérer la pectine du bois : nous avons analysé une poutre pourrie contenant *Clostridium polymyxa* en quantité moyenne.

Dans le processus de rouissage, nous savons que certaines plantes sont plus lentes à rouir que d'autres. Là encore, la vitesse de rouissage est liée à la proportion de pectine de la plante. Le lin se rouit facilement alors que le jute livre difficilement ses fibres. Dans le lin, les fibres cellulosiques sont enrobées dans une gangue essentiellement composée de pectine ; les fibres du jute sont entourées d'un tissu formé principalement d'un tiers de pectine et de deux tiers d'hémicellulose. Kundu (81) a ainsi démontré que, pour rouir le jute, il était nécessaire de mettre en jeu des microorganismes à la fois pectinolytiques et héli-

cellulolytiques. Au cours de ce processus, 60-70 % seulement de l'hémicellulose sont digérés tandis que la presque totalité de la pectine disparaît. Voici une nouvelle preuve de la grande fragilité de cette dernière substance.

Le rouissage n'est qu'un aspect particulier d'un phénomène qui se passe constamment dans la nature. L'homme arrête à temps le processus de décomposition pour récupérer les fibres textiles. Dans la nature, les fibres cellulosiques et autres libérées de leur gangue sont à leur tour décomposées, ce qui nous montre l'importance purement mécanique de la pectinolyse ; elle libère les fibres et permet la pénétration de germes cellulolytiques qui continueront la dégradation.

La pectinolyse dépend, non seulement de la proportion entre pectine et autres constituants, mais encore de la qualité de la pectine elle-même. On parle beaucoup de protopectine sans connaître exactement cette substance. La Société Américaine de Chimie applique ce terme aux pectines végétales insolubles dans l'eau et qui, après hydrolyse ménagée, donne des pectines. Ce sont, en fait, des substances hétérogènes qui pourraient résulter de liaisons mal définies de la pectine avec la cellulose, les hémicelluloses ou avec des cations polyvalents tels que Ca^{++} ou Fe^{++} . La pectine semble donc rarement libre à l'intérieur d'un tissu, mais se lie plus ou moins à d'autres substances. C'est la nature de cette liaison qui influencera en grande partie la destruction du tissu. La liaison avec le calcium est la plus connue. Ainsi, les méats intercellulaires sont constitués essentiellement de pectate ou de pectinate de calcium qui donne la rigidité aux tissus. Au contraire, la pectine proprement dite leur donne une consistance molle. On se rendra compte au laboratoire qu'un gel de pectinate de calcium, rigide, est attaqué avec beaucoup plus de difficulté (même par des germes très pectinolytiques) qu'un gel mou d'acide pectinique, non traité par le calcium. Certains auteurs pensent qu'à côté de la protopectine, il existe de la pectine en solution dans les vacuoles cellulaires. Cette pectine libre sera évidemment la proie facile des microorganismes.

La vitesse de la pectinolyse dans la nature sera en fonction d'un troisième facteur important : les microorganismes eux-mêmes. Nous avons confirmé qu'il ne s'agissait nullement de germes spécialisés, mais de microbes polyphages. C'est pourquoi la pectine est la proie de microorganismes divers et nombreux.

Tous cependant n'agissent pas avec la même efficacité, celle-ci dépend d'abord du substrat nourricier et, plus spécialement, de la source d'azote que peut utiliser le germe. Certains sont capables d'utiliser directement l'azote organique des tissus végétaux. Dans le rouissage, par exemple, *Plectridium pectinovorum* et *Clostridium felsineum* s'accablent sur les tiges de lin car ils sont capables d'attaquer les protéines

végétales ; ils concurrencent donc aisément les autres butyriques ordinaires (Beijerinck et Van Delden (9)).

Une différence semblable existe entre *Clostridium polymyxa* et *Bacillus subtilis* : le premier rouit le jute immergé dans l'eau ; le second exige, pour le faire, de l'eau peptonée (Kundu (81)). Pourtant, tous les deux ont été isolés sur le jute, en cours de rouissage par l'auteur. Sans doute *B. subtilis* profite-t-il des amines ou autres produits azotés libérés par toute la microflore du rouissage. Associé à d'autres microorganismes, il devient ainsi un rouisseur secondaire. De même, pour *Clostridium polymyxa*, nous avons remarqué que la quantité de pectine digérée était différente suivant la source d'azote : pectinolyse lente avec l'azote minéral, rapide avec l'extrait de levure. Enfin, si au laboratoire, la pectinolyse est variable suivant la composition du milieu pour un germe donné, elle le sera certainement autant dans la nature où le substratum est varié.

Chaque germe possède son pouvoir pectinolytique propre. Quelques-uns sont extrêmement puissant comme les anaérobies gazogènes ou certains Champignons ; d'autres, par contre, ne digèrent que lentement la pectine. En plus de cette appréciation quantitative, il convient d'effectuer un recensement qualitatif des enzymes de la pectinolyse ; tel germe ne pourra en effet digérer qu'une seule espèce de pectine alors qu'un autre en attaquera plusieurs sortes. Ceci est important car, d'après les diverses recherches, il faut admettre que l'on rencontre dans la nature des pectines dont le degré d'estérification est très divers. Le réceptacle des fleurs de tournesol renferme une pectine dont le degré de méthylation est élevé tandis que le radis, en plus de la pectine, contient surtout de l'acide pectique (pectate de calcium) (Kertesz (76)). Ces différentes pectines vont nécessiter bien entendu des enzymes diverses. De nombreux *Empedobacter* ne possédant qu'une seule enzyme de la pectinolyse : une endo-polygalacturonidase, ne pourront s'attaquer qu'aux acides pectiques ou aux pectines peu méthylées. Au contraire, les Champignons dont l'équipement d'enzymes pectinolytiques est varié et complet auront un spectre d'attaque beaucoup plus large. Nous avons montré que chaque enzyme a un pH maximum d'action assez net. Pour les Bactéries et les Actinomycètes le plus fort de l'attaque se produit à pH 7,5, les Champignons, eux, produisent souvent des enzymes dont l'optimum d'action se situe entre pH 4-4,5. Citons, comme exemple, l'attaque des feuilles acides de chênes. Le début de la pectinolyse est produit par des Champignons surtout *Pulularia pullulans*. Les Bactéries (*Empedobacter*) n'apparaissent que lorsque le pH du substrat devient voisin de la neutralité (Wieringa (181) et thèse, II^e partie, chapitre I).

Le rouissage sous eau entraîne le développement de Bactéries anaéro-

bies gazogènes. Celles-ci, au fur et à mesure de leur croissance, produisent des acides organiques qui acidifient fortement le milieu. Or, ces Bactéries produisent des enzymes dont le pH optimum d'action se trouve à pH 7,5. L'acidité croissante du milieu va donc gêner l'activité des enzymes pectinolytiques. Heureusement, le pH défavorable est compensé par deux facteurs :

- 1° La quantité d'enzymes s'accroît avec la culture ;
- 2° Les acides dégagés ont un pouvoir rouisseur certain, car la pectine est dépolymérisée par les acides.

Pour vérifier le premier point, on peut ajouter aux substrats enzymatiques habituels des doses croissantes de solutions enzymatiques (0,1 cm³ à 2 cm³, par exemple). On s'aperçoit alors que la limite d'action vis-à-vis du pH recule d'autant plus que la quantité de solution ajoutée est forte. Pour prouver la véracité du deuxième facteur, on ajoutera aux substrats enzymatiques des solutions de cultures acides débarrassées des enzymes pectinolytiques par chauffage à 100° C. La baisse de viscosité qui a lieu ne peut être attribuée qu'à l'acidité des solutions. De ces données, il ressort également qu'un germe n'a pas besoin d'être pectinolytique pour être rouisseur. Ainsi s'expliquerait le rouissage du lin par des germes non pectinolytiques tel que *Clostridium corallinum*. La production d'acide pourrait alors mettre en solution la pectine à partir de pectinate de calcium (= protopectine), les acides fixant les ions de calcium. Enfin, d'autres produits du métabolisme microbien interviennent pour attaquer la pectine (produits réducteurs, alcalis, acides fixes, etc.).

Ces relations entre plante et microbe nous indiquent que la pectinolyse a lieu de diverses manières dans la nature, et à des vitesses très variables. Toutefois, selon quelques mesures que nous avons faites, la pectine disparaît assez rapidement. Les dosages ont porté sur 4 terres et une litière de feuilles du bois de Boulogne. Les terres ne contenaient plus de pectine décelable par la technique du pectate de calcium. Il s'agissait pourtant de terres riches en matières organiques : mor forestier, formation tourbeuse (D7), terreau n° 6, âgé de 3 ans, terre de jardin. Ceci contraste avec les dosages effectués par d'autres auteurs pour les hémicelluloses par exemple, substance que l'on retrouve très souvent dans le sol. Par contre, les feuilles de chêne de la litière du bois de Boulogne, vieilles d'un an, contenaient encore 0,08 g de pectine pour 100 g de feuilles sèches. C'est sur ces feuilles que nous avons trouvé un grand nombre d'*Empedobacter pectinovorum* et *aquatile*. Ces germes ont donc quelque importance dans la digestion finale de la pectine des litières végétales. La pectine des végétaux, qui tombent sur le sol, est digérée quasi totalement dans l'horizon Ao ou au contact

des horizons A₀ et A₁ puisque nous n'avons pas retrouvé de pectine en A₁ avec des échantillons de sols ne contenant pas de radicules arrachées avec le prélèvement. Ici, la pectine ne parvient pas dans le sol lui-même. Il en est autrement lorsqu'il y a enfouissement de matériel végétal ou lorsque le sol contient de nombreuses radicules de divers végétaux. Le sol et, plus spécialement, les horizons A₁ et A₂ reçoivent alors de la pectine directement. Mais il semble bien que la pectinolyse s'effectue encore à l'intérieur du tissu organisé et que la pectine ne doive pas se mêler directement aux éléments habituels du sol comme c'est le cas pour les substances plus résistantes, une fois le tissu désorganisé.

Dans nos régions, la pectine des végétaux tombés sur le sol ou enfouis sera métabolisée totalement, en deux ans au maximum. Il ne restait, en effet, qu'une petite quantité de pectine dans les feuilles de chênes tombées depuis un an et plus du tout dans le terreau de feuilles de chênes âgé de trois ans. Sans doute faut-il compter un peu plus de temps pour le bois, surtout pour le bois très lignifié.

L'absence de pectine dans le mor forestier, où les chutes d'aiguilles de sapins sont fréquentes, prouve que l'acidité du sol ne ralentit guère la pectinolyse. Ce fait est certainement dû aux nombreux Champignons pectinolytiques qui se multiplient beaucoup dans ces substrats.

La vitesse de la pectinolyse est fortement accrue sous une couche d'eau. On peut le constater au cours du rouissage sous eau : après 15 jours de ce processus, on ne trouve plus trace de pectine ni dans le jute, ni dans le lin (Kundu (81)). La pectine des plantes aquatiques est aussi vite détruite car il s'agit de végétaux tendres, contenant beaucoup d'eau et de pectine. De plus, ces plantes sont envahies par des anaérobies, germes très actifs, où, sous faible couche d'eau par les *Empedobacter* bons pectinolytiques.

Dans les pays tropicaux ou plus chauds, la vitesse de la pectinolyse doit être accélérée par la chaleur. L'activation peut se faire quantitativement ; en stimulant le métabolisme du germe par la chaleur et qualitativement, en remplaçant la microflore des pays froids par une microflore pectinolytique plus active, avec un optimum de température plus élevé. Ruschmann et Bartram (141) ont montré que le rouissage dans les rivières chaudes s'opérait avec *Clostridium felsineum* alors que les rivières froides ne contenaient qu'un germe moins actif : *Plectridium pectinovorum*. Les analyses des boues froides du Ruwenzori ont révélé la présence très fréquente de *Plectridium pectinovorum* et l'absence totale de *Clostridium* pigmentés.

Quelles que soient les conditions dans lesquelles se déroulent la pectinolyse, la pectine est finalement toujours transformée en acide galacturonique. Les endo-polygalacturonidases scindent d'abord la pec-

tine en tronçons de longueurs variables d'acides polygalacturoniques (acides tétra-, tri-, digalacturoniques) ; puis ces derniers sont, à leur tour, dégradés en acide monogalacturonique. Luh et Phaff (90) ont prouvé que cette transformation en deux étapes était l'œuvre d'une seule enzyme. Nous avons également remarqué que, plus la durée du contact entre substrat et enzyme est longue, plus la quantité d'acide monogalacturonique s'accroît aux dépens des acides polygalacturoniques. Quelques auteurs pensent néanmoins, que le premier temps de décomposition est dû à une enzyme nommée dépolymérase et qu'une deuxième enzyme est nécessaire pour accomplir la démolition complète de la pectine. Peut-être en est-il ainsi pour certains germes, car Luh et Phaff n'ont travaillé que sur des levures. Le catabolisme de l'acide galacturonique exige un système enzymatique tout à fait différent de celui de la pectinolyse. Nous avons vu que le taux de digestion du galacturonate ne concordait souvent pas avec celui de la pectine et même que certains pectinolytiques comme *Bacillus pumilus* n'attaquaient pas du tout le galacturonate. De leur côté, Kilgore et Starr (77, 78) ont isolé les enzymes de dégradation de l'acide galacturonique : acide uronique-isomérase et acide céturnique-réductase pour certains germes ou déshydrogénase seulement pour d'autres. L'acide galacturonique peut être métabolisé par les pectinolytiques eux-mêmes qui tirent alors le maximum du rendement de la pectinolyse, ou par d'autres microorganismes non pectinolytiques. Les analyses de différents sols ont démontré que les Bactéries du catabolisme de l'acide galacturonique s'y trouvaient en grand nombre parfois supérieur à celui des pectinolytiques. L'acide galacturonique est donc rapidement métabolisé dans les divers substrats naturels, après la pectinolyse. D'après Kilgore et Starr, le cycle de l'acide galacturonique, une fois accompli, se rattache à un autre cycle des composés ternaires, très différent suivant le groupe de microorganismes. Avant le dégagement final de CO_2 et H_2 , toute une série de produits intermédiaires peut être élaborée et accumulée. Ceux-ci seront repris dans les substrats par d'autres microorganismes. De nombreux microorganismes effectuent seuls le cycle complet depuis l'attaque de la pectine ou de la protopectine jusqu'au dégagement final de CO_2 .

Lorsque toute trace de pectine ou d'acide galacturonique a disparu dans un substrat donné, les microorganismes pectinolytiques ne restent pas inactifs ; ce sont, en effet, des germes polyphages auxquels la pectine n'est pas indispensable. Certains Champignons, par exemple, doués à la fois de propriétés pectinolytiques et cellulolytiques, voire même ligninolytiques, continueront et termineront, en grande partie, l'attaque du tissu végétal. Il en est de même pour les Actinomycètes qui dépolymérisent une foule de substances résistantes. Les Bactéries sont moins

bien équipées. On ne connaît pratiquement pas de Bactérie pectinolytique qui soit cellulolytique, mis à part l'anaérobie trouvé par Gurfel (51). Quelques Bactéries pectinolytiques, surtout parmi les anaé-

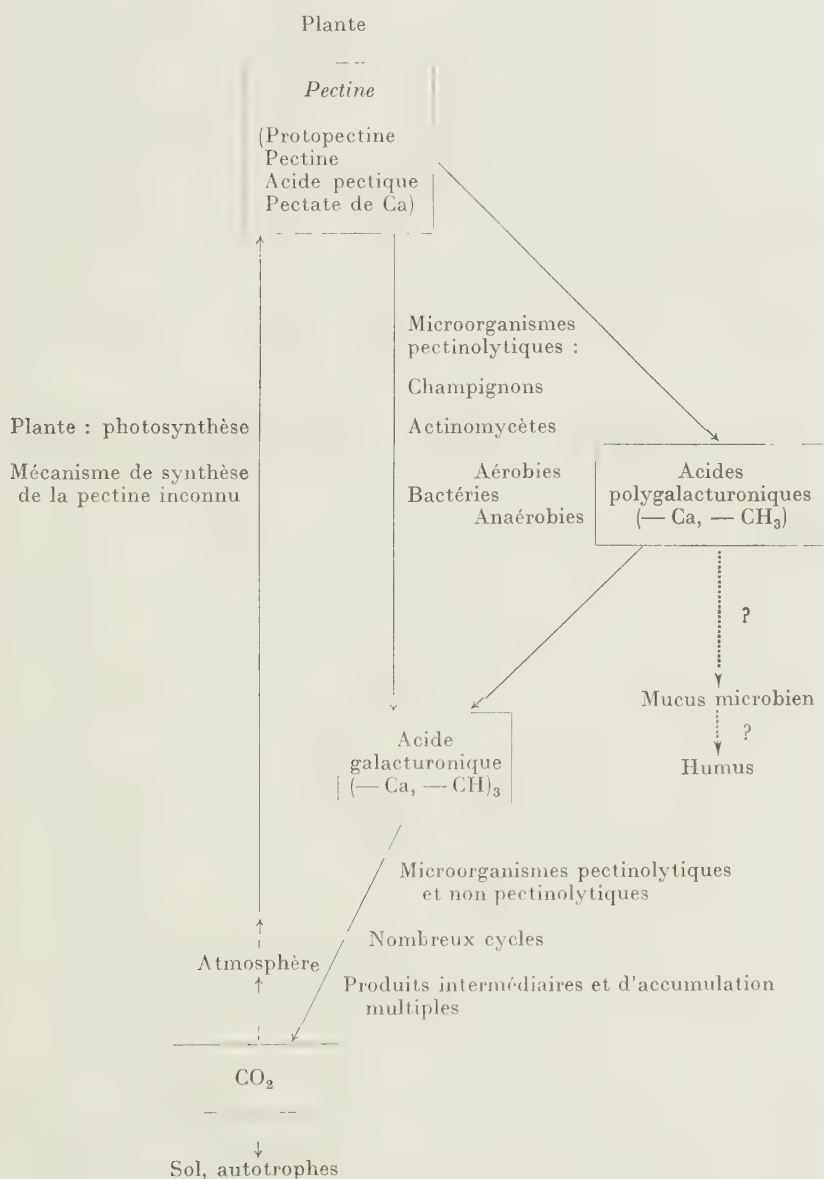


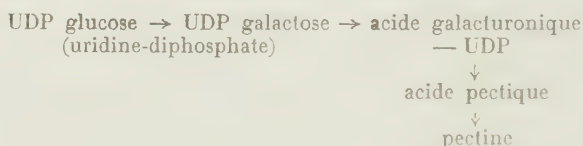
FIG. 70. — Le cycle de la pectine dans la nature.

bies, métabolisent cependant les hémicelluloses ; cette fonction est bien connue pour *Clostridium polymyxa*. Mais les Bactéries pectinolytiques exercent d'autres activités nombreuses telles que : la glucidolyse, la protéolyse, la réduction des nitrates en nitrites.

Nous sommes maintenant en mesure d'envisager le cycle entre micro-organismes et pectine dans la nature. Le schéma fondamental est évidemment identique au cycle du carbone en général (fig. 70).

Entre l'acide galacturonique et le CO_2 se situent de nombreux cycles d'où découlent maints produits intermédiaires. Les anaérobies pectinolytiques accumulent des acides volatils et fixes ainsi que de l'alcool, substances reprises par d'autres microorganismes. Certaines Bactéries pectinolytiques comme *Clostridium polymyxa* produisent du mucus qui peut servir à l'élaboration de l'humus.

La synthèse de la pectine dans la plante n'est pas encore connue. Toutefois, certains auteurs (29) ont élaboré un schéma spéculatif à partir du glucose :



SEPTIÈME PARTIE

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'historique des recherches faites sur la pectinolyse montre que ce phénomène relève dans la nature d'une activité essentiellement microbienne. Au cours des 6 dernières décades, cette fonction a surtout été étudiée du point de vue de l'activité phytopathogène des microorganismes et du point de vue des applications pratiques sur le plan du rouissage. La digestion de la pectine chez les mammifères et la pectinolyse au sein du sol sont des chapitres pratiquement négligés : c'est cette dernière activité qui fait l'objet de nos recherches.

I. — MILIEUX DE CULTURES

Les milieux mis au point pour l'appréciation de l'activité pectinolytique d'une terre ou d'un autre substrat naturel permettent la croissance de tous les groupes de germes pectinolytiques en même temps qu'une lecture simple et rapide des résultats.

Le milieu W3, en boîtes, fondé sur le principe de Wieringa est destiné avant tout à des buts écologiques pour l'appréciation qualitative des microorganismes aérobies pectinolytiques.

Le milieu W3t, en tubes, a été élaboré pour la mesure quantitative de la pectinolyse aérobie. Il s'aligne avec les techniques actuelles de numération de la microbiologie du sol.

Le milieu Vr, en tubes scellés sous vide, sert à la culture des Bactéries anaérobies pectinolytiques.

Dans le milieu W3, en boîtes, une activité pectinolytique positive se traduit par la formation de godets de liquéfaction ; dans les deux autres milieux, par la liquéfaction du gel de pectine.

Les milieux de cultures en série sont généralement à base de bouillons végétaux.

II. — L'ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE DANS LES TERRES FRANÇAISES

L'étude de 40 échantillons français de litières, de terres et de boues à l'aide des milieux W3 et Vr, permet de préciser l'écologie des divers microorganismes pectinolytiques. Ceux-ci sont des polyphages non spécialisés et appartiennent aux trois grands groupes : Champignons, Actinomycètes, Bactéries.

Les Champignons pectinolytiques sont actifs dans presque tous les substrats bien aérés. Ils n'ont pas de préférence pour un pH donné. Leur utilité est très importante dans les sols acides, riches en matières organiques : mors forestiers ou terres de bruyères car, eux seuls, s'y multiplient facilement et décomposent la pectine.

Les Actinomycètes sont les microorganismes pectinolytiques rencontrés le plus souvent sur les milieux W3. Dans les terres à pH neutre ou légèrement alcalin, riches en CaCO_3 , ils constituent plus de 90 % des godets de liquéfaction. Ils appartiennent, pour la plupart, au genre *Streptomyces*.

Parmi les Bactéries, la famille des *Pseudomonadaceæ* groupe toutes les espèces asporulées. On rencontre fréquemment les genres *Pseudomonas* et *Empedobacter*, rarement les genres *Erwinia*, *Achromobacter* ou *Acinetobacter*. Les *Empedobacter* sont surtout actifs dans les substrats riches en humus ou en matière organique végétale suffisamment décomposée, de pH neutre. Une forte humidité de même qu'une mince couche d'eau les stimulent. Ce sont les Bactéries pectinolytiques principales sur les feuilles en décomposition (deuxième stade après celui de *Pullularia pullulans*). Les *Pseudomonas* se trouvent un peu partout, davantage cependant, dans les terres de grande culture peu humifiées.

Citons parmi les pectinolytiques sporulés les plus fréquents : les *Bacillus*, les *Endosporus*, les *Clostridium* et les *Plectridium*. Les *Bacillus* avec *B. subtilis* et les *Endosporus* avec *E. circulans* n'ont pas de préférence marquée pour certains sols. Les terres de jardins, légères et riches, en contiennent un grand nombre. Parmi les *Clostridium*, il faut distinguer du point de vue de l'écologie entre *Cl. polymyxa*, micro-aérophile et les *Clostridium* anaérobies stricts. Le premier s'accommode de toutes sortes de terres surtout celles qui sont lourdes, compactes et pas trop riches en matière organique ; mais dans toutes les boues sous eau, il n'existe qu'en nombre restreint. Ce sont alors les anaérobies stricts qui le remplacent (surtout *Pl. pectinovorum*). Les sporulés pectinolytiques ne se rencontrent pas ou peu dans les litières de feuilles en décomposition.

Les Bactéries pectinolytiques se comportent comme les autres Bactéries : inhibées dans les sols acides, elles sont favorisées par un pH neutre. Elles sont stimulées par un sol riche et fertile contenant un grand nombre de microorganismes.

Les microorganismes pectinolytiques du sol sont des polyphages banaux qui possèdent, en plus, les enzymes de la pectinolyse. Ils se multiplient donc aisément sur toutes sortes de substrats en assurant de nombreuses autres fonctions à côté de la pectinolyse.

III. — LA PECTINOLYSE DANS LES SÉDIMENTS LACUSTRES DU RUWENZORI

Les boues des lacs du massif du Ruwenzori (Congo) possèdent des facteurs physicochimiques et biologiques défavorables à la croissance des microorganismes. Aussi ces derniers et les germes pectinolytiques n'y sont pas aussi nombreux que dans les échantillons français.

L'ensemble de cette étude (analyse de 58 échantillons) prouve que la pectinolyse est assurée, par les mêmes groupes de germes, dans les lacs du Ruwenzori et dans les terres et boues européennes.

Les *Empedobacter* s'isolent, de nouveau, dans les échantillons riches en débris végétaux. On rencontre aussi quelques *Pseudomonas*. Divers sédiments ont livré des espèces du groupe *Achromobacter-Acinetobacter*, mais on ne peut préciser leur écologie car ils ne se rencontrent que trop sporadiquement.

Parmi les *Sporulales*, *B. subtilis* est le germe le plus répandu. De très nombreuses boues en possèdent, en quantité variable. *Clostridium polymyxa* a été trouvé ici et là, toujours en petit nombre. Comme dans toutes les boues sous eau, il est désavantagé et remplacé par des anaérobies stricts. Ceux-ci sont surtout représenté par *Plectridium pectinovorum* que de nombreux sédiments renferment, parfois abondamment. Ce fait confirme les vues de Ruschmann et Bartram (1941) selon lesquels *Pl. pectinovorum* est un habitant des eaux froides. Les *Clostridium pectinolytiques* pigmentés, au contraire, peuplent les eaux chaudes ; c'est pourquoi nous n'en avons pas rencontré au Ruwenzori.

Les Actinomycètes et les Champignons ont été reconnus dans maints échantillons. Les Actinomycètes dominent et cela s'expliquent aisément étant donné la présence de substrats à pH bas. Mais les Champignons prennent toute leur importance dans les lacs à fluctuations de niveau, passant par des périodes d'assèchement.

IV. — LES MICROORGANISMES PECTINOLYTIQUES DE LA RHIZOSPHERE

L'étude de la pectinolyse dans la rhizosphère (12 plantes étudiées) montre que chaque plante est un cas particulier. Toutefois, certains groupes de pectinolytiques semblent être activés davantage.

Les Bactéries aérobies pectinolytiques sont nettement favorisées par la présence des racines puisque le coefficient rhizosphère moyen est de

+ 27,6. Dans ce groupe, les *Empedobacter* sont principalement stimulés : 7 plantes sur 12 possèdent *E. pectinovorum* et *E. aquatile* en abondance ; 1 plante, *E. radicum*.

Les Actinomycètes, les Champignons pectinolytiques et la totalité des Bactéries aérobies subissent de même une stimulation ; quoique de manière moindre.

Les Bactéries anaérobies et surtout les anaérobies pectinolytiques paraissent, au contraire, inhibés par la proximité des racines. Le coefficient moyen rhizosphère est négatif bien que certaines plantes augmentent un peu l'activité du groupe. Il n'existe, pour ainsi dire, pas ou peu de *Cl. polymyxa* autour des racines. La microflore totale anaérobie est accrue légèrement (coefficient moyen + 1,8).

Par la technique de culture hydroponique des plantes, on a essayé de savoir si les pectinolytiques et, plus spécialement, les *Empedobacter* stimulés de préférence dans certains cas avaient un rôle à jouer autour des racines du point de vue pectinolyse. Certaines souches sécrètent des enzymes pectinolytiques au contact des racines mais la plante elle-même ne sécrète pas de pectine dans le milieu de culture.

Le rôle de ces microorganismes, du point de vue pectinolyse, est donc incertain durant le vivant de la plante. Il est possible que la continuelle sécrétion d'enzymes de la pectinolyse oblige la plante à renforcer la paroi radiculaire. A la mort de la plante, ces germes seront de première importance, car ils contribueront à désorganiser les tissus qui retourneront à l'état minéralisé.

V. — POSITION SYSTÉMATIQUE DES BACTÉRIES PECTINOLYTIQUES ISOLÉES

Les souches des Bactéries pectinolytiques isolées se rangent, la plupart du temps, dans des espèces et genres déjà décrits et très répandus mais dont le pouvoir pectinolytique n'avait pas été étudié. Ce sont souvent des germes banaux qui possèdent, entre autres, une activité pectinolytique. Il n'y a donc pas lieu de former un genre spécial pour ranger certaines Bactéries pectinolytiques ; la propriété pectinolytique doit rester un caractère d'espèce et, tout au plus, de sous-genre pour les groupes de Bactéries très homogènes.

La classification adoptée est celle, dite de l'École française, élaborée par A.-R. Prévot (130) et J. Brisou (17).

La famille des *Pseudomonadaceæ* groupe pratiquement à elle seule toutes les Bactéries pectinolytiques asporulées. Les souches du genre *Pseudomonas* sont classées en 5 espèces dont la principale est *Ps. schuyt-*

killiensis. Les 50 souches d'*Empedobacter* se répartissent au sein de 9 espèces parmi lesquelles 4 sont nouvelles. Les espèces tête de file *E. pectinovorum* et *E. aquatile* composent le premier groupe (bâtonnets minces et longs) ; le second groupe (bâtonnets plus trapus) comprend l'espèce nouvelle : *E. radicum*.

Les pectinolytiques sporulés entrent dans les genres *Bacillus*, *Endosporus*, *Clostridium* et *Plectridium*, les deux premiers contenant des espèces surtout aérobies ; les deux autres, des germes anaérobies. *B. subtilis* (50 souches) est la Bactérie pectinolytique type du genre *Bacillus*. Une espèce nouvelle : *B. salpæ*, a été découverte dans l'intestin d'un poisson méditerranéen, la « saupe » (*Box salpa* L.). Les germes reportés dans le genre *Endosporus* seraient, selon le principe américain, admis dans le genre *Bacillus*. Mais les *Bacillus* ne peuvent contenir des bâtonnets déformés par la sporulation. Nos souches seront donc rangées parmi les *Endosporus*, *E. circulans* étant la plus représentative. Dans ce genre, deux espèces nouvelles voisines d'*E. circulans* ont été décrites : *E. humi* sans nitrate-réductase et *E. multiplex* sans gélatinase. Les *Clostridium* comprennent de nombreuses souches de *Cl. polymyxa* anaérobie facultatif. Les autres souches isolées sont des anaérobies stricts et se placent surtout dans les pectinolytiques stables et incolores. *Cl. grave* (1 souche) est une espèce nouvelle qui diffère des autres germes en particulier par sa grande taille. Dix souches sont identifiées à *Cl. laniganii*, très voisin de *Cl. eruptens* n. sp. (5 souches). Ce dernier se distingue par son activité protéolytique intense. Deux souches de *Clostridium* sont pigmentées : l'une est une espèce nouvelle : *Cl. opertum*, très protéolytique ; l'autre une variété de *Cl. felsineum*. *Plectridium pectinovorum* (35 souches) est le germe pectinolytique principal parmi les *Plectridiales* ; il ne produit jamais d'acide butyrique.

Deux souches de Myxobactériales sont déterminées comme *Angiococcus disciformis* : microcystes ronds de 15 μ de diamètre contenant des cellules arrondies, colonies orange en forme de choux-fleurs.

VI. — ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE EN CULTURE PURE DES MICROORGANISMES ISOLÉS

Les enzymes de la pectinolyse sont classées d'après le travail de Demain et Phaff (28).

Tous les microorganismes pectinolytiques isolés sécrètent des enzymes pectinolytiques exocellulaires.

Les Bactéries produisent des enzymes pectinolytiques dont le pH optimum d'action est voisin de 7. Les polygalacturonidases sont du

type endo : scission des ponts glucosidiques au hasard de la molécule, avec libération de tronçons d'acides penta- à monogalacturoniques. Toutes les souches produisent une endo-polygalacturonidase, c'est-à-dire une enzyme active sur l'acide pectique et les pectines peu méthylées mais non sur la pectine proprement dite. L'attaque de la pectine par un endo-polyméthylgalacturonidase est moins fréquente et variable suivant les espèces. La pectine-méthylestérase, qui déméthyle la pectine, est assez rare chez les Bactéries. Quelques espèces seulement la possèdent, les sporulés autant que les asporulés.

Les Actinomycètes ne possèdent pas d'enzymes distinctes de celles des Bactéries. L'action optimum s'effectue toujours à pH 7. La différence la plus marquée, entre ces deux groupes, est la fréquence de pectine-méthylestérase chez les Actinomycètes (15 souches sur 24). De plus, les polygalacturonidases de ces germes sont adaptatives alors que chez les Bactéries ces enzymes ont souvent une nature constitutive.

Les Champignons agissent tout autrement. Le pH optimum d'action s'abaisse à pH 4 pour 15 des souches étudiées (sur 25). La pectine-méthylestérase, active de pH 4 à 5, est présente chez 19 souches, mais elle est toujours adaptative comme pour les autres groupes. Trois souches possèdent une exo-polygalacturonidase active à pH 4 ; qui attaque la molécule d'acide pectique en bout de chaîne et libère ainsi de l'acide monogalacturonique seulement. Cette enzyme semble l'apanage exclusif des Champignons puisque nous ne l'avons pas retrouvée ailleurs, toutefois, certains auteurs la citent aussi chez les Bactéries.

A la lumière de ces résultats, si nous reconsidérons la classification des enzymes selon Demain et Phaff (28), deux enzymes doivent être ajoutées : l'endo-polygalacturonidase, active à pH 7,5, et la pectine-méthylestérase des Champignons, active à pH 4,5. Le système de Demain et Phaff, supérieur à ceux proposés par Schubert (147) et par Deuel et Stutz (29), possède l'avantage d'être logique et de pouvoir s'élargir facilement lors de la découverte de nouvelles enzymes de la pectinolyse.

La cinétique de la pectinolyse (analyse quantitative en fonction du temps) varie beaucoup suivant les espèces et les groupes d'espèces. En règle générale, la digestion a lieu au maximum pendant la phase logarithmique de croissance du germe. Elle est donc plus forte pendant les premiers jours de culture puis elle décroît au fur et à mesure que la culture devient plus âgée. Les germes les plus actifs se situent parmi les anaérobies gazogènes ; la digestion de la pectine peut avoir lieu à 100 % en moins de 7 jours. Viennent ensuite les Champignons qui sont fortement pectinolytiques (le taux moyen de digestion est de

70 %, quelques souches dépassent 80 %). Les Actinomycètes et les Bactéries aérobies sont des pectinolytiques moyens (taux moyen : 60 % en 10 jours).

VII. — MÉTABOLISME DE L'ACIDE GALACTURONIQUE

Le catabolisme de la pectine aboutit finalement à la production d'acide galacturonique. Il était donc intéressant de connaître son métabolisme au sein du sol et les germes pouvant l'utiliser.

Un bon nombre de Bactéries aérobies galacturonidasiques se trouvent dans le sol (étude de 28 terres et boues) ; on peut donc dire que l'acide galacturonique sera rapidement métabolisé. Les Bactéries galacturonidasiques suivent les lois qui régissent les autres Bactéries et les Bactéries pectinolytiques : partiellement inhibées dans les sols acides ou pauvres ; elles sont nombreuses dans les terres riches, à pH neutre. Le nombre de Bactéries galacturonidasiques du sol est, pour 24 échantillons, plus élevé que celui des Bactéries pectinolytiques ; ce qui indique que l'acide galacturonique est souvent attaqué par des Bactéries non pectinolytiques.

L'attaque de l'acide se fait quantitativement, de façon très variable, par les Bactéries pectinolytiques. Les anaérobies sont les plus actifs et digèrent, en général, 100 % de ce corps en 7 jours. La quantité d'acide galacturonique digérée n'est pas proportionnelle à la quantité de pectine digérée, c'est la preuve que les systèmes enzymatiques des deux corps sont complètement différents et indépendants l'un de l'autre. Cet énoncé est confirmé par le fait que certaines Bactéries pectinolytiques ne peuvent attaquer l'acide galacturonique (*Bacillus pumilus* par exemple). Ces germes sont privés d'une grande partie de l'énergie qui résulte ordinairement de la pectinolyse. On peut penser que la scission des ponts glucosidiques de la molécule de pectine est une réaction exergonique qui fournit de l'énergie, sans quoi la pectinolyse n'aurait aucun sens pour ces Bactéries.

VIII. — DISCUSSION.

RELATIONS ENTRE PLANTES ET MICROORGANISMES PECTINOLYTIQUES

La destruction de la pectine dans la nature met en jeu deux protagonistes : la plante et le microbe, et c'est de leur nature respective que dépendra l'allure de la pectinolyse.

La pectine est la plus fragile des 4 substances composant les tissus

de soutien de la plante. Ainsi, la résistance de la plante à la destruction microbienne est-elle inversement proportionnelle à la quantité de pectine qu'elle contient. La pectinolyse aura pour effet de libérer les tissus de soutien enrobés de pectine (fibres cellulosiques et ligniques par exemple) ; et facilitera la pénétration des germes cellulolytiques et autres qui continueront la dégradation. La pectinolyse dépend, non seulement de la proportion entre pectine et autres constituants, mais aussi de la qualité de la pectine elle-même. Les protopectines (liaison avec le calcium, la cellulose ou la lignine) seront bien plus résistantes que les pectines libres.

Les microorganismes les plus efficaces sont d'abord ceux qui sont capables d'utiliser directement l'azote organique des tissus végétaux. Mais la vitesse de la pectinolyse est aussi en fonction du pouvoir pectinolytique propre à chaque germe (Les anaérobies et certains Champignons sont très actifs alors que d'autres germes digèrent la pectine lentement). La qualité de l'équipement enzymatique pectinolytique intervient aussi : les *Empedobacter* ne peuvent s'attaquer qu'aux pectines déméthylées et de pH 7 ; les Champignons, au contraire, provoquent l'hydrolyse de toutes sortes de pectines acides ou neutres.

Quelques dosages de pectine dans le sol et les litières de feuilles indiquent que la pectine a complètement disparu des feuilles de chênes en deux ans, au maximum. La pectine est digérée totalement dans l'horizon Ao d'un sol et au contact d'A₁ ; elle n'a pas le temps de se mélanger au sol lui-même, comme c'est le cas pour les celluloses ou les hémicelluloses (Aucune pectine n'est retrouvée dans les horizons A₁ de divers sols).

Un cycle de la pectine dans la nature est envisagé qui est, bien entendu, semblable à celui du carbone en général. Il passe inévitablement par la formation d'acide galacturonique. Celui-ci est alors repris par toutes sortes de microorganismes pectinolytiques ou non. Avant la production finale de CO₂, de nombreux produits intermédiaires peuvent être élaborés puis repris, à leur tour, par d'autres microorganismes.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALI (M. M.). — Aerobic bacteria involved in the retting of jute. *Appl. Microbiol.*, 1958, **6**, 87-89.
2. ALLEN (L. A.). — Spore forming bacteria causing soft rot of potato and retting of flax. *Nature*, 1944, **153**, 224-225.
3. ANKERSMIT (P.). — Untersuchungen über die Bakterien im Verdauungskanal des Rindes. *Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Orig.*, 1906, **40**, 100-118.
4. ASHWELL (G.). — A new pathway of uronic-acid metabolism. *Biochim. and Biophys. Acta*, 1958, **30**, 186-191.
5. BAKER (F.) et MARTIN (R.). — Some observations of the iodophile microflora of the cæcum of the rabbit ; with special regard to the disintegration of cell-wall-substances. *Zentralbl. f. Bakt., Abt. II*, 1937, **96**, 18-35.
6. BEAVEN (G. H.) et BROWN (F.). — The pectic enzymes of the mould *Byssochlamys fulva*. *Biochem. Journ.*, 1949, **45**, 221-225.
7. BEHRENS (J.). — Untersuchungen über die Gewinnung der Hanffaser durch natürliche Röstmethoden. *Zentralbl. f. Bakt., Abt. II*, 1902, **8**, 114, 131, 161, 202, 231, 264, 295.
8. BEIJERINCK (M. W.) et VAN DELDEN (A.). — *Arch. Neerl. Sci. Ex. et Nat.*, 2^e série, 1904, **9**, 418.
9. BEIJERINCK (M. W.) et VAN DELDEN (A.). — On the bacteria which are active in flax retting. *Kon. Akad. Wetenschappen*, Amsterdam, Section Sciences, 1904, **6**, 462-481.
10. BERGEY (D. H.). — Manual of determinative bacteriology, 6^e éd., 1948, 7^e éd., 1957, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
11. BERKMAN (C. H.). — Production of pectinase, cellulases and growth-promoting substances by *Ceratostomella ulmi*. *Phytopath.*, 1956, **46**, 605-611.
12. BETRABET (S. M.) et BHAT (J. V.). — Pectin decomposition by species of *Pseudomonas* and their role in the retting of malvaceous plants. *Appl. Microbiol.*, 1958, **6**, 89-93.
13. BOSE (S. R.). — Enzymes of wood rotting fungi. *Erg. der Enzymforschung*, 1938, **8**, 267-276.
14. BOURQUELOT (E.) et HÉRISSEY (H.). — Sur l'existence dans l'orge germé d'un ferment soluble agissant sur la pectine. *C. R. Acad. Sci.*, 1899, **427**, 191-195.
15. BOURQUELOT (E.). — Sur la pectase. *Journ. Pharm. Chim.*, 1899, **9**, 56-62.
16. BRACONNOT (H.). — Recherches sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les végétaux. *Ann. Chim. Phys.*, série 2, 1825, **28**, 173-178.
17. BRISOU (J.). — Étude de quelques *Pseudomonadaceæ*. *Thèse de Sciences de Paris*, 1958, Baillet, Bordeaux.

18. BROOKS (J.) et REID (W. W.). — The complexe nature of polygalacturonase from *Aspergillus foetidus*. *Chem. and Ind.* (London), 1955, 325-326.
19. BROWN (W.). — *Ann. Botany*, 1917, **31**, 489.
20. BURKHOLDER (W. H.) et STARR (M. P.). — The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopath.*, 1948, **38**, 500-510.
21. CARBONE (D.). — *Ann. Igiene Sperim.*, 1916, **26**, 1 et 57.
22. CARBONE (D.). — *Staz. Sper. Agr. Ital.*, 1917, **50**, 261.
23. CARBONE (D.) et TOMBOLATO (L.). — Sulla macerazione rustica della canapa. *Staz. Sper. Agr. Ital.*, 1917, **50**, 563.
24. CHALVIGNAC (M.-A.). — Effet Rhizosphère comparé du lin en culture hydroponique et en terre. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 474-479.
25. CHEFFTEL (H.). — Utilisation industrielle des fruits. *Ét. J.-J. Carnaud Bulletin n° 7*, Paris, 1943.
26. CHONA (B. L.). — *Ann. Bot.*, 1932, **46**, 1035.
27. DE BARY (A.). — Über einige Sklerotien und Sklerotienkrankheiten. *Bot. Ztg.*, 1886, **44**, 378-381.
28. DEMAÏN (A. L.) et PHAFF (H. J.). — Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances. *Wallerstein Lab. Comm.*, 1957, **20**, 119-131.
29. DEUEL (H.) et STUTZ (E.). — Pectic substances and pectic enzymes. *Advances in Enzymology*, 1958, **20**, 341-361.
30. DONKER. — *Thèse Sciences*, Delft, 1927.
31. DOREY (M. J.). — A pectolytic Flavobacterium. *Journ. of Gen. Microbiol.*, 1959, **20**, 91-95.
32. DOWSON (W. J.). — *Nature*, 1943, **152**, 331.
33. DOWSON (W. J.). — Spore forming bacteria pathogenic to plants. *Nature*, 1945, **154**, 557.
34. DOWSON (W. J.). — Plant diseases due to bacteria. Cambridge University Press, 1957.
35. DUGGELI (M.). — Die Bakterien des Waldbodens. *Schweiz. Zeitschrift für Forstwesen*, 1923, **1**, 267.
36. ECHANDI (E.). — Pectolytic enzymes secreted by soft-rot bacteria. *Phytopath.*, 1957, **47**, 549-552.
37. ECHANDI (E.) et WALKER (J. C.). — Pectolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopath.*, 1957, **47**, 303-306.
38. EHRLICH (F.). — Über die Pektolase, ein neu aufgefundenes Pektinferment I, II. *Biochem. Zeitsch.*, 1932, **250**, 525-534; **251**, 204-222.
39. EHRLICH (F.). — Über die Chemie des Pektins. II. Mitteilung : Eine typische Reaktion der *D*-Galakturonsäure und des Pektins. *Ber. der deut. chem. Gesells.*, 1932, **65**, 352-358.
40. ELIEZER (I.) et HAYMAN (H. J. C.). — Mean square length and mean square radius of gyration of 1,4'-polysaccharides and of polybutadienes. *Journ. Polymer. Sci.*, 1957, **23**, 387-402.
41. ETHELLES (J. L.) et BELL (T. A.). — Travail non publié, 1950. Voir KERTESZ (Z. I.) : The pectic substances, p. 348.
42. ETHELLES (J. L.), BELL (T. A.), MONROE (R. J.), MASLEY (P. M.) et DEMAÏN (A. L.). — Populations and softening enzyme activity of filamentous fungi and flowers ovaries and fruit of pickling cucumbers. *Appl. Microb.*, 1958, **6**, 424-440.

43. FERNANDO (M.) et STEVENSON (G.). — Effect of the condition of potato tissue as modified by temperature and water-content upon attack by certain organisms and their pectinase enzymes. *Ann. Bot.*, 1952, **16**, 103-107.
44. FRÉMY (E.). — *J. Pharm. et des Sciences accessoires*, 1840, **26**, 292.
45. FRIBES, cité par WINOGRADSKY (S.). — Sur le rouissage du lin et son agent microbien. *C. R. Acad. Sci.*, 1895, **121**, 742-745.
46. FULLER (W. H.) et NORMAN (A. G.). — Biochemical changes involved in the decomposition of hemp bark by pure culture of fungi. *J. Bact.*, 1946, **50**, 667-671.
47. FURNICHI (M.) et OKAMOTO (T.). — Studies on the yeast pectin enzymes. *J. of the Agric. Chem. Soc. of Japan*, 1954, **28**, 703-709.
48. GIACOMA (R.) et DE GRAZIA (S.). — Histologische und chemische Untersuchungen über die Zersetzung der Pflanzen. *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1906, **15**, 212-215.
49. GRASSMANN (W.), STADLER (R.) et BENDER (R.). — Zur Spezifität Cellulose und Hemicellulose spaltender Enzyme. *Ann. der Chemie*, 1933, **502**, 20-40.
50. GRASSMANN (W.) et ZECHMEISTER (L.). — Über den enzymatischen Abbau der Cellulose und ihre Spaltprodukte. *Ann. der Chemie*, 1933, **503**, 167-179.
51. GURFEL (D. B.). — A new incitant of pectin fermentation. *Mikrobiologija*, 1959, **28**, 167-179.
52. HARDING (H. A.) et STEWART (F. C.). — A bacterial soft rot of certain cruciferous plant. *Science N. S.*, 1902, **16**, 314.
53. HARRISON (F. C.). — Soft rot. *Science N. S.*, 1902, **16**, 152.
54. HARTER (L. L.). — A physiological study of *Mucor racemosus* and *Diplodia tubericola*, two sweet potato storage-rot fungi. *J. Agr. Res.*, 1925, **30**, 961-969.
55. HARTER (L. L.) et WEINER (P.). — *Am. J. Botany*, 1923, **10**, 127, 167, 245.
56. HAUMANN (P. M. L.). — Étude microbiologique et chimique du rouissage aérobie du lin. *Ann. Inst. Pasteur*, 1902, **16**, 379-385.
57. HAWORTH (W. W.). — *Proc. Roy. Soc. (London)*, 1946, **186**, 1.
58. HELLINGER (E.). — *Clostridium aurantibutyricum* n. sp. A pink butyric acid *Clostridium*. *J. Gen. Microbiol.*, 1947, **1**, 203-211.
59. HUSAIN (A.) et RICH (S.). — Extracellular pectic and cellulolytic enzymes of *Cladosporium cucumerinum*. *Phytopath.*, 1958, **48**, 316-320.
60. JACOBELLI (G.). — Utilisation de milieux de culture gélifiés par des substances pectiques. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 228-230.
61. JERMYN (A.) et TOMKINS (R. G.). — The chromatographic examination of the product of the action of pectinase on pectin. *Biochem. J.*, 1950, **47**, 437-448.
62. JONES (D. R.). — A medium for investigating the breakdown of pectin by bacteria. *Nature*, 1946, **158**, 625-626.
63. JONES (G. E.). — A note on the preparation of a pectate gel medium. *Proc. Soc. for Appl. Bact.*, 1950, **13**, 170-171.
64. JONES (G. E.). — Pectolytic activity in some farmwater supplies. *J. of Appl. Bact.*, 1956, **19**, 231-236.
65. JONES (L. R.). — *Bacillus carotovorus* n. sp., die Ursache einer weichen Fäulnis der Möhre. *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1901, **7**, 12, 61.

66. JONES (L. R.). — The cytolytic enzyme produced by *Bacillus carotovorus* and certain other soft rot bacteria. *Zentralbl. f. Bakt., Abt. II*, 1905, **14**, 257-263.
67. JONES (L. R.), MORSE (W. J.) et HARDING (K. A.). — *New York State Agr. Exp. Sta. Bull.*, 1909, **41**, 118.
68. KAISER (P.) et CHALVIGNAC (M. A.). — Une méthode nouvelle pour la mesure quantitative de l'activité pectinolytique aérobie des terres. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 462-465.
69. KAISER (P.) et PRÉVOT (A.-R.). — Méthode améliorée d'étude quantitative de la pectinolyse microbienne dans le sol. *C. R. Acad. Sciences*, 1958, **247**, 1065-1067.
70. KAJI (A.). — On the polygalacturonase action of *Cl. felsenium* var. *sikokianum*. *J. of the Agric. Chem. Soc. Japan*, 1953, **27**, 699-704.
71. KAJI (A.). — On the polygalacturonase action of Bacteria of genus *Clostridium*. *J. of the Agric. Chem. Soc. Japan*, 1954, **28**, 695-700.
72. KAJI (A.) et ANABUKI (Y.). — On the purification and properties of bacterial polygalacturonases. *J. of the Agric. Chem. Soc. Japan*, 1955, **29**, 775-780.
73. KAMAL (M.) et WOOD (R. K. S.). — Pectic enzymes secreted by *Verticillium dahliae* and their role in the development of the wilt disease of cotton. *Ann. Appl. Biol.*, 1956, **44**, 322-340.
74. KERR (A.). — A method for isolating soft-rotting bacteria from soil. *Nature*, 1953, **172**, 1155.
75. KERTESZ (Z. I.). — Pectic enzymes. *Ergebnisse der Enzymforschung*, 1936, **5**, 233-258.
76. KERTESZ (Z. I.). — The pectic substances. Interscience Publishers, New York, 1951.
77. KILGORE (W. W.) et STARR (M. P.). — Uronate oxydation by phytopathogenic *Pseudomonas*. *Nature*, 1959, **183**, 1412-1413.
78. KILGORE (W. W.) et STARR (M. P.). — Catabolism of galacturonic and glucuronic acid by *E. carotovora*. *The J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 2227-2230.
79. KOLB (J.). — Recherches sur le blanchiment des tissus. *C. R. Acad. Sci.*, 1868, **66**, 1024-1027.
80. KRAGHT (A. J.) et MORTIMER (M. P.). — Pectic enzymes of *E. carotovora*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, **42**, 271-276.
81. KUNDU (A. K.). — Studies on the microbiological retting of jute. *Thèse D. Phil.*, Université de Calcutta, 1960.
82. LAMBINA (V. A.). — Distribution of soil bacteria fermenting vegetal protopectin in fields subjected to grassland agriculture crop alteration. *Mikrobiologuija*, 1957, **26**, 66-74.
83. LANIGAN (G. W.). — Relationship of fibre quality to bacterial flora of flax retting. *Nature*, 1950, **165**, 516-517.
84. LANIGAN (G. W.). — Studies on the pectinolytic anaerobes *Clostridium flavam* and *Clostridium laniganii*. *J. Bact.*, 1959, **77**, 1-5.
85. LAPWOOD (D. H.). — On the parasitic vigour of certain bacteria in relation to their capacity to secrete pectolytic enzymes. *Ann. Botany (London)*, 1957, **21**, 167-175.
86. LAURENT (E.). — Recherches expérimentales sur les maladies des plantes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, **13**, 1-11.

87. LEPOUTRE (M.). — Recherches sur la transformation expérimentale de bactéries banales en races parasites des plantes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1902, **16**, 304-309.
88. LUH (B. S.) et PHAFF (H. J.). — Studies on polygalacturonase of certain yeasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, **33**, 212-215.
89. LUH (B. S.) et PHAFF (H. J.). — Properties of yeast polygalacturonase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **48**, 23-30.
90. LUH (B. S.) et PHAFF (H. J.). — End products and mechanism of hydrolysis of pectin and pectic acid by yeast polygalacturonase (Y. P. G.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **51**, 102-113.
91. LYS (H.). — Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. I. Pektin als C-Quelle. *Arch. Mikrobiol.*, 1959, **33**, 266-282.
92. MCCOMBS (E. A.) et MCCREADY (R. M.). — Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. *Anal. Chem.*, 1957, **29**, 819-821.
93. MCCOY (E.) et MCCLUNG (L. S.). — The nature and systematic position of a new chromogenic *Clostridium*. *Arch. Mikrobiol.*, 1935, **6**, 230-238.
94. MANGIN (L.). — Sur la constitution de la membrane des végétaux. *C. R. Acad. Sci.*, 1888, **107**, 144-146.
95. MARMIER (M.), cité par DUCLAUX dans : *Traité de Microbiologie*, 1901, **4**, 453.
96. MATUS (J.). — Untersuchungen über die Aktivität der Pektinase. *Ber. der Schweiz. Bot. Gesellschaft*, 1948, **58**, 319-360.
97. MAYO (J. K.). — *New phytologist*, 1925, **24**, 162.
98. MENON (K. P. V.). — *Ann. Botany* (London), 1934, **48**, 187.
99. MEYER (F. H.). — Untersuchungen über die Aktivität der Mikroorganismen in Mull, Moder und Rohhumus. *Arch. Mikrobiol.*, 1959, **33**, 149-169.
100. MILLS (G. B.). — A biochemical study of *Pseudomonas prunicola* (Wormald). *Biochem. J.*, 1949, **44**, 302-305.
101. MITSCHERLICH. — *Monatsber. der Berliner Akad.*, 18 mars 1850, 102.
102. MOLLARET (H.) et DE BRAUCOURT (J.). — Biotopes de hautes altitudes, Ruwenzori. I. Exploration du Parc National Albert, sér. 2, fasc. 3, Institut des Parcs Nationaux du Congo Belge, Bruxelles, 1956.
103. MORELL (S.), BAUR (L.) et LINK (K. P.). — Polygalacturonic acid-methylglucosides derived from pectin. *J. Biol. Chem.*, 1934, **105**, 1-13.
104. MOSSEL (D. A. A.), V. GOLSTEIN (G. W. M.) et DE BRUN (A. S.). — A simplified method for the isolation and study of obligate anaerobes. *J. of Path. and Bact.*, 1959, **78**, 290.
105. NORTHCOTE (D. H.). — The cell walls of higher plants. *Biol. Reviews*, 1958, **33**, 53-102.
106. NYLANDER (L.). — *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 1867, sér. VII, 214, 219.
107. OLLIVER (M.) et RENDLE (T.). — A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssoschlamys fulva*. *J. Soc. Chem. Ind. (Transactions)*, 1934, **53**, 170-172.
108. OMELIANSKI (W.). — Die histologischen und chemischen Veränderungen der Leinstengel unter Einwirkung der Mikroben der Pektin und Cellulosegärung. *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1904, **12**, 33-43.
109. ORLA-JENSEN (A. D.) et KLUYVER (A. J.). — Notiz über den Erreger der Warmwasserflachsrost in Holland. *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1939, **101**, 257-261.

110. OXFORD (A. E.). — Production of a soluble pectinase in a simple medium by certain plant pathogenic bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*. *Nature*, 1944, **154**, 271-272.
111. OZAWA (J.). — Studies on pectic enzymes : on the specificity of polygalacturonases. *J. of the Agric. Chem. Soc. Japan*, 1952, **26**, 505-511.
112. PALMER (K. J.), HARTZOG (M. B.). — An X-ray diffraction investigation of sodium pectate. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 2122-2127.
113. PATON (A. M.). — Pectin decomposing strains of *Pseudomonas*. *Nature*, 1958, **181**, 61.
114. PAYNE (W. J.). — Studies on bacterial utilization of uronic acids : induction of oxydative enzymes in a marine isolate. *J. of Bact.*, 1958, **76**, 301-311.
115. PAYNE (W. J.) et McRORIE (R. A.). — Glucuronate isomerase from *Serratia marcescens*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1958, **29**, 466-467.
116. PHAFF (H. J.). — The production of exocellular pectic enzymes by *Penicillium chrysogenum*. I. On the formation and adaptative nature of polygalacturonase and pectinesterase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1947, **13**, 67-73.
117. PHAFF (H. J.) et DEMAIN (A. L.). — The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.*, 1956, **218**, 875-884.
118. PITMAN (G. A.) et CRUESS (W. V.). — Hydrolysis of pectin by various microorganisms, a comparative study. *Ind. Eng. Chem.*, 1929, **21**, 1292-1294.
119. POCHON (J.). — Manuel technique d'analyse de microbiologie du sol, 1954, Masson et C^{ie}, Paris.
120. POCHON (J.) et DE BARJAC (H.). — Traité de Microbiologie du sol, 1958, Dunod, Paris.
121. POTTER (M. C.). — On a bacterial disease ; the white rot of the turnips. *Proc. Durham Philos. Soc. (England)*, novembre 1899, 107-115.
122. POTTER (M. C.) et FOSTER (M.). — On the parasitism of *Pseudomonas destructans*. *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1901, **7**, 353-361.
123. POTTER (L. F.) et MCCOY (E.). — The fermentation of pectin and pectic acid by *B. polymyxa*. *J. of Bact.*, 1955, **70**, 656-662.
124. PRAZMOWSKI (A.). — *Botan. Ztg.*, 1879, 414.
125. PRAZMOWSKI (A.). — Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten. *Inaug. Dissert.*, 1880, Leipzig.
126. PRÉVOT (A.-R.). — Propriétés pectinolytiques et rouissantes de *Clostridium corallinum*. *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 1531-1533.
127. PRÉVOT (A.-R.). — Étude d'une bactérie anaérobie chromogène nouvelle : *Clostridium saturni-rubrum*. *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 1035-1037.
128. PRÉVOT (A.-R.). — Étude d'un nouvel anaérobie chromogène : *Plectridium virens* n. sp. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 662-664.
129. PRÉVOT (A.-R.). — Rouissage et anaérobies pectinolytiques. IX Congresso Internazionale industrie agrarie, 27 mai 1952, Rome.
130. PRÉVOT (A.-R.). — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies, 2^e édition (1948), 3^e édition (1957), Masson, Paris.
131. PRÉVOT (A.-R.). — Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies, 1960, Édition de la Tourelle, Paris.
132. PRÉVOT (A.-R.) et RAYNAUD (M.). — Étude sur la systématique des *Clostridium* pectinolytiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 424-425.

133. PRÉVOT (A.-R.), THOUVENOT (H.) et KAISER (P.). — Étude de douze souches anaérobies pectinolytiques de l'intestin des poissons et des boues d'eau douce et salée. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 429-434.
134. RAYNAUD (M.). — Les bactéries anaérobies pectinolytiques. *U.I.S.B.*, 1949, sér. B, n° 7, 434-470.
135. REID (W. W.). — Estimation and separation of the pectinesterase and polygalacturonase of micro-fungi. *Nature*, 1950, **166**, 569.
136. REID (W. W.). — The pectic enzymes of the fungus *Byssoschlamys fulva*. *Biochem. J.*, 1951, **50**, 289-292.
137. ROELOFSEN (P. A.). — Polygalacturonase activity in yeast, *Neurospora* and tomato extract. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1953, **10**, 410-423.
138. ROBOZ (E.), BARRAT (R. W.) et TATUM (E. L.). — Pectic enzymes from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, 1952, **195**, 459-467.
139. ROSSI (G.) et CARBONE (D.). — *Atti Ist. Incor. Napoli*, 1908, **4**, 1.
140. RUSCHMANN (G.) et BARTRAM (H.). — Untersuchungen über den Verdarb von Flachsfasern und Leinengarnen. *Zentralb. f. Bakt.*, Abt. II, 1940, **102**, 300, 365.
141. RUSCHMANN (G.) et BARTRAM (H.). — *Bacillus felsineus* (Carbone) und seine Bedeutung für die Flachsrötte. *Zentralb. f. Bakt.*, Abt. II, 1942; 1943, **105**, 326-351.
142. SÄVERBORN (S.). — A contribution to the knowledge of the acid polyuronides, Uppsala, 1945.
143. SAISSAC (R.), BRUGIÈRE (J.-M.) et RAYNAUD (M.). — Activité pectinolytique de quelques bactéries anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 356-361.
144. SAITO (H.). — Pectic glycosidases of *Aspergillus niger*. *J. Gen. and Appl. Microbiol.*, 1955, **1**, 38-43.
145. SCHARDINGER (F.). — *Bacillus macerans*, ein acetonbildender Rottebacillus. *Zentralb. f. Bakt.*, Abt. II, 1905, **14**, 772-781.
146. SCHNEIDER (G.) et BOCK (H.). — Über die Konstitution der Pektinstoffe. *Ber. der deutschen chem. Gesells.*, 1937, **70**, 1617-1630.
147. SCHUBERT (E.). — Einfluss von Wasserstoff und Alkali-Ionen auf den enzymatischen Abbau von Pektin verschiedenen Veresterungsgrades durch Pektglycosidasen und Pektglycosidasegemische. *Helv. Chim. Acta*, 1954, **37**, 691-700.
148. SCHEFFER (R. P.). — Physiological aspects of *Verticillium wilt*. *Phytopath.*, 1956, **46**, 83-90.
149. SINGH (R. K.) et WOOD (R. K. S.). — The production and properties of pectic enzymes secreted by *Fusarium moniliforme*. *Ann. Botany* (London), 1956, **20**, 89-95.
150. SMITH (R. E.). — The parasitism of *Botrytis cinerea*. *Bot. Gaz.*, 1902, **33**, 421-432.
151. SMITH (W. K.). — A survey of the production of pectic enzymes by plants pathogenic and other bacteria. *J. of Gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 33-41.
152. SMITH (W. K.). — Chromatographic examination of the products of digestion of pectic materials by culture solutions of plant pathogenic and other bacteria. *J. of Gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 42-47.
153. SOMOGYI (M.). — A new reagent for the determination of sugars. *J. of Biol. Chem.*, 1945, **160**, 61-68.

154. SORDELLI (A.) et SORIANO (S.). — L'isolement de *Bacillus felsineus* et son existence en République Argentine. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1515-1517.
155. SORIANO (S.). — Nuevo bacilo anaerobio enriador del lino. *Rev. del Inst. Bact.* (Buenos Aires), 1930, **5**, 741-757.
156. SORIANO (S.). — Investigaciones sobre las bacterias anaerobias activas en el enriamento industrial del lino. *Inst. de Microbiol. Agric. Buenos Aires*, 1950, 174-200.
157. SRIVASTANA (D. N.), ECHANDI (E.) et WALKER (J. C.). — Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Rhizopus stolonifer*. *Phytopath.*, 1959, **49**, 145-159.
158. STÖCKLI (A.). — Studien über den Einfluss des Regenwurmes auf die Beschaffenheit des Bodens. *Landwirts. Jahrb. der Schweiz.*, 1928, **42**, 1-38.
159. STOERMER (K.). — Über die Wasserröste des Flachses. *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1904, **43**, 35, 171-306.
160. STUART (N. W.) et EMSWELLER (S. L.). — Use of enzymes to improve cytological technics. *Science*, 1943, **98**, 569-570.
161. SUGAMA (S.) et DOI (S.). — Propriété pectinolytique de *Clostridium* souche n° 314 et sa position dans la systématique. *C. R. Soc. Biol.*, 1960, **454**, 874-877.
162. TAKEHAMA (H.) et OGURA (N.). — Studies on pectic enzymes : Characterization from pectic enzymes from « sclase ». *J. of the Agric. Chem. Soc. of Japan*, 1954, **28**, 881-886.
163. TAKEHAMA (H.) et OGURA (N.). — Studies on pectic enzymes : on the pectic enzymes from fungi. *J. of the Agric. Chem. Soc. Japan*, 1955, **29**, 83-88.
164. TRECUL (A.). — Matière amylacée et cryptogames amylières dans les vaisseaux du latex de plusieurs Apocynées. *C. R. Acad. Sci.*, 1865, **61**, 156-160.
165. TRECUL (A.). — Production de plantules amylières dans les cellules végétales pendant la putréfaction. *C. R. Acad. Sci.*, 1865, **61**, 432-436.
166. TRECUL (A.). — Réponse à trois notes de M. Nylander concernant la nature des *Amylobacter*. *C. R. Acad. Sci.*, 1867, **65**, 513-521.
167. TRIBE (H. T.). — On the killing of plant cells by enzymes from *Botrytis cinerea* and *B. aroideæ*. *Ann. Bot. (London)*, 1955, **49**, 381-385.
168. TUTIN (F.). — The behaviour of pectin towards alcalis and pectase. *Biochem. J.*, 1921, **15**, 494-497.
169. VAN HALL (G. J. J.). — *Bacillus subtilis* und *B. vulgatus* als Pflanzenparasiten. *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1902, **9**, 642-651.
170. VAN HALL (G. J. J.). — Soft rot. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten*, 1903, **13**, 129-134.
171. VAN TIEGHEM (P. H.). — *Bull. Soc. Bot. France*, 1877, **24**, 128.
172. VAN TIEGHEM (P. H.). — Sur la fermentation de la cellulose. *C. R. Acad. Sci.*, 1879, **88**, 205-210.
173. VOLCANI (C.) et DOWSON (W. J.). — A plant disease caused by a spore forming bacterium under natural conditions. *Nature*, 1948, **161**, 980.
174. WAGGONER (P. E.) et DIAMOND (A. E.). — Production and role of extracellular pectic enzymes of *Fusarium oxysporum* *F. lycopersici*. *Phytopath.*, 1955, **45**, 79-85.
175. WARD (H. M.). — A lily disease. *Ann. of Bot.*, 1888, **2**, 319-324.

-
176. WEHMER (M.). — Untersuchungen über Kartoffelkrankheiten. *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1898, **4**, 540, 570, 627, 694, 734, 764, 795.
177. WEIZMANN (C.) et HELLINGER (E.). — Studies on some strains of butyric acid producing *Plectridia* isolated from hemp, jute and flax. *J. Bact.*, 1940, **40**, 665-682.
178. WERCH (S. C.), JUNG (R. W.) et DAY (A. A.). — The decomposition of pectin and galacturonic acid by intestinal bacteria. *J. of Infect. Diseases*, 1942, **70**, 231-250.
179. WIERINGA (K. T.). — A method for the rapid isolation of aerobic pectin decomposing microorganisms. 4^e Congrès Microb. Copenhagen, 1947, section VII, 482-483.
180. WIERINGA (K. T.). — On the dissimilation of pectic substances in nature. *Congrès Microbiol. Intern. Rome*, 1953, VI, 281-282.
181. WIERINGA (K. T.) et SMIT (J.). — Microbiological decomposition of litter. *Nature*, 1953, **171**, 794-795.
182. WINOGRADSKY (S.). — Sur le rouissage du lin et son agent microbien. *C. R. Acad. Sci.*, 1895, **121**, 742-745.
183. WINSTEAD (N. N.) et WALKER (J. C.). — Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. *Phytopath.*, 1954, **44**, 153-161.
184. WOOD (R. K. S.). — Pectic enzymes produced by *B. aroidæ*. *Nature*, 1951, **167**, 771-772.
185. WOOD (R. K. S.). — Pectic enzymes produced by *B. aroidæ*. *Ann. Bot. (London)*, 1955, **49**, 1-4.
186. WOOD (R. K. S.) et GUPTA (S. C.). — Some properties of the peptic enzymes secreted by *Pythium debaryanum*. *Ann. Bot. (London)*, 1958, **22**, 309-315.
187. WOOD (R. K. S.). — Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease. *Ann. Rev. of Plant. Phys.*, 1960, **11**, 299-322.
188. ZELLER (S. M.). — *Ann. Missouri Bot. Garden*, 1916, **3**, 439.
-

TABLE DES MATIÈRES

Introduction et historique.

	Pages
La pectine, substance végétale	3
Structure et propriétés physicochimiques des substances pectiques..	4
La pectinolyse, activité essentiellement microbienne (historique)..	10
Conclusions à l'historique	44

Travaux personnels.

PREMIÈRE PARTIE. — <i>Matériel et technique</i>	45
---	----

<i>Chapitre premier.</i> — MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'APPRÉCIATION QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES GERMES PECTINOLYTIQUES D'UNE TERRE....	47
--	----

Microorganismes aérobies	47
Microorganismes anaérobies	56

<i>Chapitre II.</i> — ISELEMENT, CULTURES EN SÉRIE, CONSERVATION DES BACTÉRIES PECTINOLYTIQUES	62
--	----

Aérobies	62
Anaérobies	63
Conclusions aux chapitres I et II	65

<i>Chapitre III.</i> — PRÉLÈVEMENT, ANALYSE PHYSICOCHIMIQUE, ENSEMENCEMENT DES ÉCHANTILLONS DE TERRES	67
---	----

DEUXIÈME PARTIE. — <i>Étude de différentes terres, boues et autres substrats naturels</i>	69
---	----

<i>Chapitre premier.</i> — ÉCHANTILLONS FRANÇAIS	71
Conclusions au chapitre I	112

<i>Chapitre II.</i> — LES SÉDIMENTS LACUSTRES DU RUWENZORI	115
Conclusions au chapitre II	161

	Pages
<i>Chapitre III. — LA RHIZOSPHÈRE</i>	166
Conclusions au chapitre III	189
 TROISIÈME PARTIE. — Description et position systématique des Bactéries pectinolytiques isolées	
	199
<i>Chapitre premier. — TECHNIQUES D'ÉTUDES</i>	202
<i>Chapitre II. — EUBACTÉRIES ASPORULÉES</i>	206
Conclusions au chapitre II	221
<i>Chapitre III. — EUBACTÉRIES SPORULÉES</i>	223
Conclusions au chapitre III	241
<i>Chapitre IV. — MYXOBACTÉRIALES</i>	242
Considérations générales à la Troisième Partie	245
 QUATRIÈME PARTIE. — Activité pectinolytique des microorganismes isolés et de collection	
	247
<i>Chapitre premier. — TECHNIQUES D'ÉTUDES</i>	251
<i>Chapitre II. — ASPORULALES</i>	259
Conclusions au chapitre II	286
<i>Chapitre III. — SPORULALES</i>	289
Conclusions au chapitre III	317
<i>Chapitre IV. — MYXOBACTÉRIES</i>	318
<i>Chapitre V. — ACTINOMYCÈTES</i>	321
Conclusions au chapitre V	335
<i>Chapitre VI. — CHAMPIGNONS</i>	336
Conclusions au chapitre VI	357
Considérations générales à la Quatrième Partie	358
 CINQUIÈME PARTIE. — Métabolisme de l'acide galacturonique	
	363
<i>Chapitre premier. — TECHNIQUES D'ÉTUDES</i>	367
<i>Chapitre II. — ACTIVITÉ BACTÉRIENNE DANS QUELQUES TERRES ET BOUES.</i> ..	368
Conclusions au chapitre II	373

	Pages
<i>Chapitre III. — ACTIVITÉ GALACTURONIDASIQUE DES BACTÉRIES PECTINOLYTIQUES ISOLÉES</i>	376
Conclusions au chapitre III	378
<i>SIXIÈME PARTIE. — Discussion : relations entre plantes et micro-organismes pectinolytiques</i>	381
<i>SEPTIÈME PARTIE. — Résumé et conclusions générales</i>	393
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	403

IMPRIMERIE BARNÉOUD S. A.

LAVAL (Mayenne)

N° 4320 — 11-1961

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

La photosynthèse chez les bactéries.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 2 novembre 1961.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. ZAMANSKY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN ROCHE.

